

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie živočichů



Mgr. Vladimír Nerandžič

Modulace synaptického přenosu nociceptivní informace

Modulation of nociceptive synaptic transmission

Typ závěrečné práce:

Disertační práce

Školitel: MUDr. Jiří Paleček, CSc.

Akademie věd České republiky

Fyziologický ústav, v.v.i.

Oddělení funkční morfologie

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praha, 2018

.....

Mgr. Vladimír Nerandžič

Prohlášení spoluautorů

Jménem všech spoluautorů prohlašuji, že Mgr. Vladimír Nerandžič podstatně přispěl ke všem publikacím, jež jsou nedílnou částí této disertační práce. U publikací, kde je prvním autorem, se aktivně podílel na přípravě a provedení experimentů, analýze dat, interpretaci výsledků a přípravě manuskriptů.

Praha, 2018

.....

MUDr. Jiří Paleček, CSc., školitel

Poděkování

Děkuji svému školiteli, MUDr. Jiřímu Palečkovi, CSc., za odborné vedení dizertační práce i cenné rady a čas, který mi věnoval po dobu studia. Mé poděkování též náleží celému oddělení Funkční morfologie AVČR: Zejména Mgr. Dianě Špicarové, Ph.D. za uvedení do tajů elektrofyziologických měření; RNDr. Petře Mrózkové, Ph.D., Mgr. Natálii Kalynovské, Mgr. Petru Adámkovi a Kateřině Kramerové za velmi přátelskou atmosféru nejen na pracovišti a neocenitelnou spolupráci na výzkumných projektech.

Své partnerce Kristýně děkuji za neutuchající podporu i pochopení v průběhu celého studia. A svému synovi Samuelovi vděčím za velkou porci duševní hygieny, bez které by dopsání práce bylo mnohem těžší.

Abstrakt

Modulace synaptického přenosu v zadních rožích míšních představuje důležitou součást rozvoje a udržování patologických bolestivých stavů. Nezastupitelnou roli v této modulaci hrají tzv. transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) a kanabinoidní receptory 1 (CB1) exprimované na presynaptických zakončeních primární aferentů. Za fyziologických podmínek jsou TRPV1 receptory pronociceptivní, zatímco CB1 receptory tlumí nociceptivní signalizaci. Oba receptory však sdílejí stejného endogenního agonistu anandamid (AEA), který je syntetizován z N-arachidonoylfosfatidylethanolaminu (20:4-NAPE).

Tato práce se zaměřuje především na účinek aplikace 20:4-NAPE za kontrolních podmínek a po navození periferního zánětu a na související možnou interakci mezi TRPV1 a CB1 receptory. První pokusy prokázaly výrazné zvýšení hladiny anandamidu za podmínek *in vitro* z míšních řezů po aplikaci 20:4-NAPE, jeho prekurzoru. Další experimenty byly prováděny snímáním excitačních postsynaptických proudů (mEPSC a sEPSC) v superficiálních neuronech zadních rohů míšních na akutních míšních řezech metodou patch-clamp. Aplikace 20:4-NAPE vedla k výraznému poklesu frekvence mEPSC a sEPSC proudů. Za kontrolních podmínek byl tento pokles frekvence po aplikaci 20:4-NAPE blokován aplikací inhibitorů CB1 receptorů. Po navození periferního zánětu byl účinek 20:4-NAPE zprostředkován aktivací TRPV1 a CB1 receptorů. Tyto výsledky naznačují, že 20:4-NAPE má výrazný inhibiční účinek na frekvenci excitačních postsynaptických proudů, ale jeho mechanismy se liší za kontrolních podmínek a při periferním zánětu. Interakce míšních presynaptických TRPV1 a CB1 receptorů může hrát významnou roli ve zpracování nociceptivních podnětů za patologických bolestivých stavů.

Druhým cílem bylo ověření role cytokinu tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF α) na synaptický přenos na míšní úrovni za fyziologických a patologických stavů. V této studii byl testován vliv inkubace TNF α na synaptickou aktivitu nociceptivních primárních aferentů. Snímány byly sEPSC a mEPSC proudy na kontrolních míšních řezech a na míšních řezech ze zvířat po navození modelu periferní neuropatie přerušením sedacího nervu. Výsledky ukazují, že po přetěti sedacího nervu dochází k výraznému nárůstu frekvence mEPSC proudů snímaných z neuronů v superficiálních oblastech zadních rohů míšních ve tkáňových řezech. Tento efekt byl částečně zprostředkován TNF α indukovanou modulací TTX-senzitivních sodných kanálů. Nervové poranění také zvýšilo citlivost TRPV1 receptorů vůči endogenním agonistům.

Tato dizertační práce popisuje některé základní mechanismy patologických bolestivých stavů, ať již po navození periferního zánětu či poranění nervu. Bližší studium těchto změn a jejich pochopení může nabídnout další možné cíle pro vývoj inovativních analgetik.

Abstract

Modulation of synaptic transmission in the spinal cord dorsal horn plays an important role in development and maintenance of pathological pain states. The indisputable part of this modulation is conducted via activity of the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) and the cannabinoid receptor 1 (CB1), expressed on presynaptic endings of primary afferents in the superficial spinal cord dorsal horn. Under physiological conditions, activation of TRPV1 receptors is pronociceptive while CB1 receptor activation leads to attenuation of nociceptive signalling. However, both receptors share also one endogenous agonist anandamide (AEA) that may be produced from N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine (20:4-NAPE).

Main objective of this thesis focuses on the effect of 20:4-NAPE on nociceptive synaptic transmission in spinal cord slices under naïve and inflammatory conditions and consequent on the possible interaction of TRPV1 and CB1 receptors. First, 20:4-NAPE application induced significant release of anandamide from spinal cord slices under *in vitro* conditions. Next, patch-clamp recordings of excitatory postsynaptic currents (mEPSC and sEPSC) from superficial dorsal horn (DH) neurons in acute spinal cord slices were used. 20:4-NAPE application under the physiological conditions induced a significant reduction of mEPSC and sEPSC frequency that was sensitive to CB1 receptor antagonist application. After induction of peripheral inflammation activation of TRPV1 receptors played also an important role in the process. These results indicate that 20:4-NAPE has significant inhibitory effect at the spinal cord level both under naïve and inflammatory conditions, while peripheral inflammation altered the underlying mechanisms. The interaction between the TRPV1 and CB1 receptors may play an important role in the nociceptive processing during pathological pain conditions, together with local increase of AEA levels by its precursor application.

A second objective of my thesis was to investigate the role of a cytokine tumor necrosis factor α (TNF α) in physiological and pathological pain states. In this study, the modulatory effect of TNF α incubation on synaptic activity from primary afferents was tested. The sEPSC and mEPSCs recordings were conducted on acute spinal cord slices prepared from animals after sciatic nerve transection and in controls. The results demonstrated enhancement of spontaneous transmitter release by TNF α -induced modulation of TTX-sensitive sodium channels after sciatic nerve transection, in primary afferent fibres in the spinal cord DH. The nerve injury also sensitised TRPV1 receptors to application of endogenous agonist.

This thesis is focused on the mechanisms underlying the pathological pain development following either peripheral inflammation or nerve injury. Understanding mechanisms of such changes could provide possible new targets for innovative analgesic development.

Seznam zkratek

AA aminokyseliny

ACEA arachidonyl-2-chloroethylamid

AKAP protein kotvící proteinkinázu A (A-kinase anchoring protein)

AMPA α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionová kyselina

AP-1 aktivační faktor-1

ASK1 apoptosis signal-regulated kinase-1

ATP adenosintrifosfát

BDNF mozkový neurotrofní faktor

BSA hovězí sérový albumin

CaMKII proteinkináza závislá na Ca^{2+} a kalmodulinu

CB1(2) kanaboidní receptor 1(2)

CGRP peptid odvozený od genu pro kalcitonin

CNS centrální nervová soustava

COX cyklooxygenáza

DAG diacylglycerol

DH dorsal horn (zadní roh míšni)

DMSO dimethylsulfoxid

DRG dorsal root ganglion (zadní kořen míšni)

EPSC excitační postsynaptický proud

ERK extracelulárním signálem aktivovaná kináza

FADD fas-associated DD protein

GABA kyselina γ -aminomáselná

GDNF gliální nervový růstový faktor

GPCR Receptor spřažený s trimerními G-proteiny

H_2O_2 peroxid vodíku

IASP Mezinárodní organizace pro výzkum bolesti

IKK I κ B kináza

IL interleukin

IPSC inhibiční postsynaptický proud

I κ B inhibiční protein NF- κ B

JNK c-Jun N-terminalní kináza

LTD dlouhodobá deprese

LTP dlouhodobá potenciace

mEPSC miniaturní excitační postsynaptický proud

NAPE N-arachidonoylfosfatidylethanolamin

NAPE-PLD N-arachidonoylfosfatidylethanolamin fosfolipáza D

NF- κ B jaderný faktor κ B

NGF nervový růstový faktor

NMDA N-methyl-D- aspartát

NS nervová soustava

OLDA N-oleoyldopamin

PG prostaglandin

PI3K fosfatidylinositol 3-kináza

PIP2 fosfoinositol-4,5-bisfosfát

PKA proteinkináza A

PKC fosfokinasa C

PKC proteinkináza C

PLC fosfolipasa C

PNS periferní nervová soustava

R receptor (např. AMPA R)

RTX resiniferatoxin

SB366791 – antagonist TRPV1 receptorů

SEM standardní odchylka aritmetického průměru

sEPSC spontánní excitační postsynaptický proud

SP substance P

TNFR Receptor tumor nekrotizujícího faktoru alfa

TNF α tumor nekrotizující faktor α

TRP Transient receptor potential

TRPV Transient receptor potential vanilloid (subfamily)

TRPV1 transient receptor potential vanilloid 1

Obsah

1	Literární přehled.....	11
2	Úvod.....	11
3	Anatomické a fyziologické podklady nocicepce.....	13
3.1	Anatomické podklady nocicepce	13
3.1.1	Identifikace nociceptivních neuronů v DRG.....	14
3.1.2	Šedá hmota míšní a nocicepce	14
3.1.3	Rexedovo členění míchy a míšní neurony	15
3.1.4	Senzorické dráhy.....	17
3.1.5	Míšní nociceptivní synapse.....	18
3.2	Fyziologie a patofyziologie bolesti	20
3.2.1	Typy bolestivých stavů	20
3.2.2	Patofyziologické bolestivé stavy – periferní zánět a neuropatická bolest.....	22
3.2.3	Centrální senzitivace	24
4	Molekulární mechanismy nocicepce.....	28
4.1	Vaniloidní TRPV1 receptor	28
4.2	Struktura TRPV1 receptoru	28
4.3	Nociceptivní úloha TRPV1 receptoru.....	31
4.3.1	Senzitivace a aktivace TRPV1 receptorů	31
4.3.2	Desenzitivace TRPV1 receptoru a analgetické účinky kapsaicinu	33
4.3.3	Role periferních TRPV1 receptorů – souhrn	34
4.3.4	Úloha TRPV1 receptorů v synaptickém přenosu zadního rohu míšního	35
4.4	Kanabinoidní CB1 receptor	37
4.5	Struktura CB1 receptoru	38
4.6	Úloha CB1 receptoru v nocicepci	39
4.6.1	Signální kaskády aktivované CB1 receptory	40
4.6.2	Desenzitivace CB1 receptoru	43
4.6.3	Role periferních CB1 receptorů v nocicepci.....	43
4.6.4	Úloha CB1 receptoru v synaptickém přenosu v zadním rohu míšním.....	46
4.7	Endovaniloidy/endokanabinoidy	48
4.8	Nociceptivní úloha prozánětlivého cytokinu TNF α a napětově závislých Na $^+$ 1.3 a 1.8 kanálů v neuropatické bolesti.....	52
5	CÍLE PRÁCE.....	55
6	Metody	56

6.1	Použité chemikálie.....	56
6.2	Použité roztoky.....	57
6.3	Příprava míšních řezů.....	58
6.4	Elektrofyzilogická měření.....	59
6.4.1	Aparatura a příslušenství.....	59
6.4.2	Skleněné mikroelektrody.....	59
6.4.3	Metoda terčíkového zámku (patch clamp).....	60
6.4.4	Aplikace látek.....	60
6.5	Analýza dat.....	61
6.6	Periferní neurogenní zánět jako model zánětlivé bolesti.....	62
6.7	Přetětí sedacího nervu jako model neuropatické bolesti.....	62
6.8	Behaviorální metody – testování citlivosti zvířat k tepelným podnětům.....	62
6.9	Hmotnostní spektrometrie AEA.....	62
7	Výsledky.....	64
7.1.1	Produkce anandamidu <i>in vitro</i> po exogenním podání jeho prekursoru N-arachidonoylfosfatidylethanolaminu (20:4-NAPE).....	64
7.2	Úloha prekursoru anandamidu N-arachidonoylfosfatidylethanolaminu (20:4-NAPE) v modulaci nociceptivní signalizace - mEPSC.....	65
7.2.1	Obecná charakteristika neuronů snímaných pro mEPSC.....	65
7.2.2	Aplikace 20:4-NAPE vedla ke snížení frekvence mEPSC v neuronech zadních rohů míšních.....	65
7.2.3	Inhibičnímu efektu 20:4-NAPE na mEPSC zabránila aplikace CB1 antagonisty, ne však TRPV1 antagonisty.....	66
7.2.4	V modelu periferního zánětu inhibičnímu působení NAPE zabránila aplikace antagonisty TRPV1 receptorů, ne však aplikace antagonisty CB1 receptorů.....	68
7.3	Úloha prekursoru anandamidu N-arachidonoylfosfatidylethanolaminu (20:4-NAPE) v modulaci nociceptivní signalizace – sEPSC.....	71
7.3.1	Obecná charakteristika neuronů snímaných pro sEPSC.....	71
7.3.2	Aplikace 20:4-NAPE vedla ke snížení frekvence sEPSC v neuronech zadních rohů míšních.....	71
7.3.3	Inhibičnímu efektu 20:4-NAPE na spontánní aktivitu zabránila aplikace CB1 antagonisty, ne však TRPV1 antagonisty.....	72
7.3.4	Aplikace 20:4-NAPE snížila frekvenci sEPSC v neuronech zadních rohů míšních za podmínek periferního zánětu.....	75
7.3.5	Během periferního zánětu byl inhibiční vliv 20:4-NAPE na frekvenci sEPSC zprostředkován CB1 a částečně TRPV1 receptory.....	75
7.4	Úloha prozánětlivého cytokinu TNFα v modulaci nociceptivní signalizace.....	79

8	Diskuze	83
8.1	Produkce anandamidu v míšních řezech po aplikaci 20:4-NAPE.....	83
8.2	Vliv 20:4-NAPE na miniaturní excitační postsynaptické proudy v nociceptivní signalizaci	84
8.3	Vliv 20:4-NAPE na spontánní excitační postsynaptické proudy v nociceptivní signalizaci	89
8.3.1	Aktivace CB1 a TRPV1 receptorů anandamidem.....	89
8.3.2	Vliv periferního zánětu	90
8.4	Vliv TNF α na nociceptivní synaptický přenos v míše v modelu neuropatické bolesti	92
9	Závěr	96
10	Použitá literatura	97
11	Seznam publikací autora	116
12	Příloha – originály plných textů publikací	117

1 Úvod

Bolest hraje klíčovou úlohu v ochraně organismu před jeho možným poškozením. Jedná se o komplexní jev na smyslové i emocionální úrovni. Mezinárodní asociace pro studium bolesti (IASP) definuje bolest jako „nepříjemnou vjemovou a emocionální zkušenost související se skutečným nebo potenciálním poškozením tkáně, nebo je jako takové poškození popisované“. Vnímání bolesti je vždy tedy subjektivní a závisí na momentálních okolnostech a psychickém a fyzickém stavu jedince. Z definice IASP však také vyplývá, že bolest nemusí vždy plnit svoji fyziologickou funkci, ale zejména v případě delšího trvání sama může přerůst v samostatné onemocnění výrazně snižující kvalitu života.

Příčiny zvratu od fyziologické úlohy bolesti k patologii jsou často obtížně identifikovatelné. Dochází k nim jak v rámci nocicepce, tedy detekce bolestivého podnětu v periférii těla až po přivedení informace o jeho přítomnosti do mozku, tak v rámci vnímání bolesti a utrpení, tedy negativní emocionální odpovědi mozku nejen na bolestivý podnět, ale také na stres, strach, úzkost a dalšími psychologickými stavy (Von Roenn 2006). Patologická bolest představuje velmi obtížně léčitelný stav díky variabilitě příčin způsobujících dysfunkci nociceptivního systému. Pro vývoj účinnějších metod léčby je nutné detailně poznat a popsat mechanismy fyziologické nocicepce i její změny za patologických stavů. Výzkum v této oblasti již odhalil celou řadu molekul podílejících se na jejím vzniku i další modulaci. Také byla vyvinuta řada zvířecích modelů simulujících patologické bolestivé stavy, které jsou nezbytné pro pochopení analogických procesů u člověka.

Již od konce minulého tisíciletí je v popředí zájmu mnoha laboratoří TRPV1 receptor – transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 – identifikovaný v roce 1997 (Caterina, Schumacher et al. 1997). Tento receptor je někdy také nazýván kapsaicinový, díky schopnosti kapsaicinu jej aktivovat. Vliv TRPV1 receptoru na přenos a molekulární integraci nociceptivních podnětů v periferní nervové soustavě (PNS) je již poměrně důkladně zmapován. Avšak TRPV1 receptory se vyskytují ve velké míře i v presynaptických zakončeních primárních aferentů v zadních rožích míšních, tedy v centrální nervové soustavě (CNS), kde jejich úloha není dosud zcela objasněna (Spicarova, Nerandzic et al. 2014). Dosavadní studie naznačují jejich výrazné modulační účinky na transmissi nociceptivního signálu, zejména za patologických podmínek

(Spicarova and Palecek 2008; Spicarova and Palecek 2009). Významnou měrou k ovlivnění nociceptivní signalizace i v souvislosti s funkcí TRPV1 receptorů také přispívají gliové buňky. Vylučují řadu látek, cytokinů a dalších, které upravují synaptický přenos. Vlivu cytokinu TNF α na aktivitu TRPV1 receptorů a modulaci synaptického přenosu za patologických podmínek je věnována jedna ze studií v této práci.

Vedle TRPV1 receptorů jsou intenzivně studovány mimo jiné také kanabinoidní receptory, zejména CB1, které jsou společně s kapsaicinovými receptory exprimovány na primární aferentech nociceptivních vláken (Binzen, Greffrath et al. 2006). Obecně je úloha CB1 receptorů v nocicepci mnohem lépe popsána než v případě TRPV1 receptorů. Potlačují bolestivé chování a podílejí se antinociceptivních mechanismech za fyziologického i patologického stavu (Pertwee 2009; Bushlin, Rozenfeld et al. 2010). Kanabinoidní a vaniloidní receptory mohou být aktivovány mnoha agonisty, mimo jiné endogenních molekul. Některé z nich mohou aktivovat oba receptory v závislosti na koncentraci a dalších aspektech. Mezi takové molekuly patří například anandamid (AEA).

Tato dizertační práce se zaměřuje především na úlohu TRPV1 a CB1 receptorů v modulaci nociceptivní signalizace a jejich změny za patologických bolestivých stavů. Znalost detailních mechanismů, kterými tyto receptory přispívají k nociceptivní signalizaci, může naznačit další možné cesty v léčbě bolesti.

2 Literární přehled

2.1 Anatomické a fyziologické podklady nocicepce

2.1.1 Anatomické podklady nocicepce

Koncepce zvláštního typu periferních nervových vláken vedoucích bolestivé podněty se poprvé objevila v práci C. Sherringtona již v roce 1906 (Brooks and Tracey 2005). Pozdější studie tuto koncepci potvrdily (Burgess and Perl 1967; Hunt and Mantyh 2001; Jordt and Julius 2002) a ukázaly, že existuje několik typů senzorických vláken – nociceptivních primárních aferentů – reagujících pouze na podněty vyvolávajícími bolest (vysoká teplota, nízké pH, nadměrný tlak apod.) a nikoliv na dráždění nebolestivými stimuly. Jinými slovy, podobně jako ostatní sensorické modality jsou i mechanismy nocicepce založené na vlastnostech zvláštní populace neuronů se specifickou dráždivostí (Julius and Basbaum 2001).

Nociceptivní primární aferenty patří mezi pseudounipolární neurony s těly uloženými v dorsálních gangliích (DRG) podél míchy. Tyto neurony mají dva výběžky: První - periferní, který reaguje na podněty z vnějšího prostředí; druhý vedoucí tyto podněty do zadního rohu míšního (DH). Za fyziologického stavu se nociceptivní signalizace účastní neurony označované jako A δ a C. Obě skupiny jsou polymodální, reagují tedy na více různých podnětů. Liší se však velikostí somat, myelinizací axonů a tím pádem i rolí v celé nocicepci.

Neurony typu A δ mají středně velká těla a slabě myelizované axony, které vedou podněty rychlostí 3 – 30 m*s⁻¹. Jejich úlohou je zprostředkovávat akutní bolestivé podněty, vyžadující rychlou reakci organismu. A δ zahrnují volná nervová zakončení tlaku, chladové termoreceptory a především přenášejí akutní bolestivé vzruchy (ostrá bolest). A δ vlákna, respektive jejich periferní zakončení (tzv. nociceptory) dělí na dvě podskupiny – I a II, které se liší v tepelné citlivosti. Nociceptory typu I reagují na vysokou teplotu $\geq 53^{\circ}\text{C}$ a neurony typu II odpovídají již při teplotě cca 43°C (Julius and Basbaum 2001).

Druhý typ nociceptivních aferentů, tzv. C vlákna, je zcela nemyelizovaný a vedení vzruchů je tím pádem pomalé (0,5 – 2 m*s⁻¹). Těla C vláken mají nejmenší průměr v porovnání se všemi senzorickými neurony v DRG. Aktivace těchto vláken vede ke vjemu pomalé a tupé bolesti (Brooks and Tracey 2005).

V dorsálních gangliích se nacházejí také další typy senzorických neuronů, dávající vznik myelinizovaným vláknům A β . Za běžných okolností jejich dráždění nebolestivými podněty z kůže a svalů vede k tlumení bolesti. Ovšem za patologických podmínek se i tyto typy vláken mohou podílet na vzniku bolestivých vjemů (Julius and Basbaum 2001).

2.1.1.1 Identifikace nociceptivních neuronů v DRG

Jednotlivé populace senzorických neuronů ve spinálních gangliích mohou být určeny na základě exprese/přítomnosti řady molekulárních markerů. Konkrétní subpopulace nociceptivních neuronů se liší v expresi iontových kanálů, zejména napětově závislých (voltage-gated) vápníkových, sodných i draselných kanálů (Binzen, Greffrath et al. 2006). Základnímu dělení C vláken se také věnují Snider a McMahon ve své studii (1998), která popisuje dvě kategorie těchto neuronů: Peptidergní, exprimující CGRP (calcitonin gene-related peptid), a non-peptidergní, které jsou schopny vázat rostlinný isolektin IB-4. Peptidergní neurony exprimují kromě CGRP také substanci P a receptor TrkA, který váže neurotropní růstový faktor (NGF). Non-peptidergní neurony jsou specifické přítomností napětově závislých draslíkových kanálů K_v 1.4, vylučováním gliálního růstového faktoru, GDNF, a purinergního receptoru P₂X (Snider and McMahon 1998; Vydyanathan, Wu et al. 2005).

Dalším rozdílem mezi těmito subpopulacemi nociceptivních neuronů je synaptické napojení na míšní úrovni, které bude popsáno podrobněji v následující kapitole. Peptidergní neurony zasahují svými centrálními výběžky především do laminy I a II_o dle Rexedova členění (vizte dále), oproti tomu non-peptidergní vytvářejí synapse ve vnitřní lamině II_i zadního rohu míšního.

Různorodost těchto buněk (receptorová vybavenost, vylučování různých peptidů, synapse v míše, inervace různých částí periferie organismu) umožňuje reagovat na podněty různé kvality a intenzity.

2.1.1.2 Šedá hmota míšní a nocicepce

Mícha je první křižovatkou mezi periferií a centrální nervovou soustavou (CNS) a zde se také nacházejí první synapse nociceptivních drah v rámci CNS. Senzorické neurony spinálních ganglií díky akčním potenciálům (AP) přenášejí informace do zadních rohů míšních. I proto je modulace signalizace na míšní úrovni jedním z klíčových prvků celé

nocicepce. Může zde docházet k výrazné amplifikaci signálu a jeho dalšímu šíření do vyšších center, tak i k naprostému útlumu této signalizace.

2.1.1.3 Rexedovo členění míchy a míšní neurony

Cytoarchitektonický popis míchy dle Rexeda (1952) je založen na hustotě a velikosti neuronů v paralelních vrstvách, tzv. laminách I – X v dorso-ventrální rovině (obr. 1). Laminy I a II jsou často souhrnně označovány jako superficiální vrstva. Z pohledu nociceptivní signalizace tvoří zásadní část šedé hmoty míšní, neboť do ní projikují nociceptivní primární aferenty A δ i C. V lamině I, marginální zóně, se nacházejí především velké projekční neurony vytvářející synapse s A δ primárními aferenty. Lamina II, označovaná též jako *substantia gelatinosa*, obsahuje především interneurony. Do této laminy projikují C vlákna. Pozdější podrobnější studie laminu II rozdělily ještě na část vnější (II_o – „outer“) a vnitřní (II_i – „inner“) na základě expresí různých receptorů a centrálních zakončení primárních aferentů.

Laminy III a IV představují oblast, kde se nalézají těla neuronů a synapse spinothalamického traktu (společně s laminou V), který se podílí na příjmu informací o bolestivých a tepelných signálech i lehkých taktilních podnětech (A β vlákna z DRG). Lamina V je vedle superficiální vrstvy další významnou nociceptivní oblastí. Zpracovává nociceptivní signály přenášené C vlákny z viscerálních orgánů, svalů a šlach. Lamina VI, tzv. *nucleus dorsalis*, je zřetelná pouze ve zduřeních na úrovni segmentů odstupu nervů končetin. Je také poslední laminou zadního rohu míšního a podílí se na zpracování odpovědi na rychlou bolest: Kontroluje zejména reflexní úhyb od zdroje bolesti.

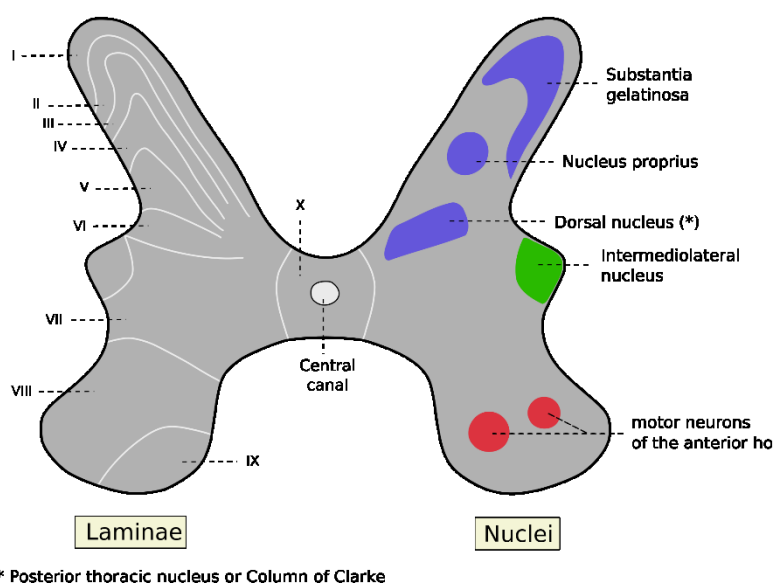
Přední roh míšní je tvořen laminami VII – IX. Lamina VII obsahuje autonomní motorické neurony sympatických drah, lamina VIII motorické interneurony a lamina IX motorické a sympatické neurony. Lamina X obklopuje centrální míšní kanál.

V zadních rozích míšních lze identifikovat tři základní typy neuronů podle cílové oblasti signalizace:

- 1) Propriospinální neurony, které integrují a modulují laterální a segmentální signalizaci. Jejich těla i všechny výběžky se nacházejí pouze v míše.
- 2) Interneurony propojují a modulují interlaminární signalizaci (tzv. heterosynaptická plasticita).
- 3) Projekční neurony přenášejí informace do vyšších pater CNS.

Především interneurony a projekční neurony jsou z hlediska nocicepce klíčové. Největší populaci interneuronů lze nalézt v lamině II. Dle typu hlavního neurotransmiteru jsou děleny na excitační a inhibiční. Excitační interneurony vylučují glutamát a řadu neuropeptidů a nepřímo, polysynapticky, aktivují projekční neurony. Inhibiční interneurony rozlišujeme na GABAergní (hlavním neurotransmiterem je kyselina γ -aminomáselná) a glycinergní (glycin), přičemž se ale vyskytují i interneurony vylučující oba neuropřenašeče. Inhibiční interneurony vytvářejí přímé kontakty s projekčními neurony i primárními aferenty. Tím tlumivě působí na pre- i postsynaptické nociceptivní mechanismy.

Projekční neurony se nacházejí především v laminách I, V a VI (Dostrovsky 2005). Jejich axony zasahují do vyšších etáží míchy či mozku a vytvářejí tak vzestupné dráhy (podrobněji vizte následující kapitola/sekce). Morfologicky byly popsány tři základní typy projekčních neuronů – pyramidové, fusiformní a zploštělé – multipolární, přičemž fusiformní a multipolární projekční buňky je možné aktivovat nociceptivním podnětem (Todd 2002). Dle schopnosti zpracovávat různé typy stimulů z primárních aferentů je dělíme na nízkoprahové (low-threshold, LT), vysokoprahové (high-threshold, HT) a se širokým dynamickým rozsahem (wide dynamic range, WDR). Nízkoprahové neurony slouží ke zpracování nebolestivé stimulace (např. taktilní podněty z primárních A β vláken). Vysokoprahové jsou nociceptivní projekční neurony, které se nacházejí především v lamině I (II_o), řidčeji v hlubokých laminách IV – VI. V opačném poměru se v těchto laminách (zejména ve vrstvách IV – VI, řidčeji I, II_o a X) vyskytují projekční neurony typu WDR, které zpracovávají nebolestivé i bolestivé vstupy z kůže, svalů i útrobních orgánů. Synapse tedy tvoří s primárními aferenty jak A β , tak A δ i C vláken (Millan 1999).



Obrázek 1 Rexedovo členění: Levá polovina obrázku znázorňuje Rexedovy laminy, pravá jednotlivá míšní jádra:

- Lamina I odpovídá přibližně posteriomarginálnímu jádru
- Lamina II \approx substantia gelatinosa
- Lamina III – IV \approx nucleus proprius
- Lamina VI se nachází v míšních segmentech odstupu končetin (totéž platí i pro nucleus dorsalis)
- Lamina VII (v míšním segmentu L3) se nachází nucleus intermediolateralis. Zde vznikají pregangliová vlákna sympatiku.
- Lamina VIII obsahuje především motorické neurony.

Pro nocicepci jsou klíčové dorzální laminy I a II, kam ústí většina periferních nociceptivních vláken z periferie. Pro tyto laminy je typické velké množství menších neuronů, jejichž hustota klesá směrem k ventrální části míchy (vnější lamina II_o – outer – obsahuje vyšší množství neuronů než lamina II_i – inner, neboli vnitřní). Do laminy I projikují především nociceptivní A δ vlákna, zatímco peptidergní C vlákna mají terminály hlavně v lamině I a II_o, přičemž část těchto vláken ale může projikovat i do hlubších lamin. Mechanosenzitivní A β vlákna projikují do lamin III – V a také částečně do laminy II_i (Rexed 1952); obrázek převzat z (Wikimedia 2017).

2.1.1.4 Senzorické dráhy

Senzorický systém zpravuje o stavu vnitřního prostředí i změnách ve vnějším prostředí. Je tvořen senzorickými drahami, které signalizují z jednotlivých částí těla do mozku. Při jejich poškození je narušena schopnost zpracovávat příslušné vjemy. Je-li takto porušena nocicepce, ať už na periférii či na centrální úrovni, může se vyvinout neuropatická bolest. Nociceptivní podněty jsou přiváděny z volných nervových zakončení přes těla neuronů zadními kořeny do míchy. Po přepojení na projekční neurony v míše je následný signál veden axony těchto projekčních neuronů. Axony vedou kontralaterálně, často už ve stejném segmentu jako je tělo tohoto neuronu či v sousedních

míšní oblasti. Následně se sdružují do provazců vzestupných drah ústících v příslušných mozkových centrech. Pro nocicepci je zásadní projekce do thalamu a mozkového kmene. Mozkový kmen je klíčový především pro zpracování zkušenosti a následné změny ve vnímání bolesti, neboť z něj vycházejí další dráhy ovlivňující přední mozek (Tracey and Mantyh 2007). Úloha thalamu spočívá ve zpracování odlišných složek bolesti – afektivně-motivační a smyslové. Thalamus také ovlivňuje zpětnou inhibici nociceptivní signalizace na úrovni zadního rohu míšního a změny na úrovni thalamu jsou jednou z příčin rozvoje neuropatické bolesti (Ahmad and Abdul Aziz 2014).

Ascendentní dráhy vedoucí nejen k thalamu a mozkovému kmeni lze rozdělit na přímé a nepřímé. Důležitou nociceptivní drahou vedoucí do ventroposterolaterálního a ventroposteromediálního thalamu je *tractus spinothalamicus*. Ten integruje nociceptivní stimuly přijatých projekčními neurony v lamině I a V zadních rohů míšních (Patestas and Gartner 2006). Spinomesencefalická dráha přímo signalizuje do periakvadukální šedi a jader retikulární formace středního mozku. Poslední přímou drahou je spinoretikulární, projikující do jader retikulární formace a Varolova mostu.

Nepřímé ascendentní dráhy jsou před dosažením vyšších center přepojovány na neurony „druhého řádu“. Rozlišujeme dvě hlavní dráhy, spinocervikothalamickou dráhu (*tractus spinocervicalis*) a zadní provazce míšní, které však zajišťují především taktilní a tlakové čítí a propriocepci a na nocicepci se přímo nepodílejí.

Senzorické podněty z obličejové části jsou vedeny podobnými drahami začínajícími v trigerminálních jádrech.

Modulace v kterékoliv oblasti nociceptivních drah může ovlivnit celkový vjem bolesti, avšak z tohoto hlediska jsou klíčové míšní synapse primárních aferentů, jimž je věnována následující kapitola.

2.1.1.5 Míšní nociceptivní synapse

Primární nociceptivní aferenty projikují převážně k neuronům v superficiální oblasti (lamina I a II_o) zadního rohu míšního. Zde dochází k nejdůležitějšímu ovlivnění intenzity signálu přicházejícímu z periferie. Dlouhodobé excitační změny na těchto synapsích vedou k centrální senzitivizaci, což je jeden ze zásadních prvků rozvoje patologických bolestivých stavů. Obecně se na této úrovni nociceptivní signalizace odehrává celá řada

pochodů, jejichž objasnění může přispět k pochopení mechanismů bolesti a následně lepší léčbě patologických bolestivých stavů.

Vlastní synaptický přenos je ovlivněn celou řadou proměnných: Množstvím uvolněného neurotransmiteru, jeho metabolickým obratem v synaptické štěrbině, typy, množstvím a kinetikou receptorů na presynaptické a postsynaptické membráně, pravděpodobností otevření iontových kanálů atd. Všechny tyto proměnné jsou regulovány mnoha různými způsoby.

Nociceptivní aferenty excitují míšní projekční neurony výlevem glutamátu ze svého centrálních zakončení. V případě rychlého excitačního synaptického přenosu jsou do něj zapojeny převážně AMPA a kainátové receptory vyvolávající excitační postsynaptické proudy (EPSC). Další typ iontových glutamátových kanálů, NMDA receptory, se na rychlém přenosu také podílí, ale až po uvolnění tonického bloku Mg^{2+} díky depolarizaci postsynaptické membrány. Analogické mechanismy fungují u rychlých inhibičních postsynaptických proudů (IPSC). Ty jsou vyvolávány inhibičními přenašeči, glycinem a GABA aktivujícím příslušné ionotropní receptory. To vede k hyperpolarizaci membrány vtokem Cl^- inhibičními kanály (Woolf and Salter 2000). Projekční neurony v lamině I jsou za fyziologických podmínek pod neustálým vlivem GABAergních a glycinergních, inhibičních interneuronů (Yoshimura and Nishi 1995; Dahlhaus, Ruscheweyh et al. 2005). Tím dochází k zaostření konkrétní synapse, adekvátní odpovědi na podnět (funkční oddělení jednotlivých senzorických modalit, prevence případné hyperalgesie, allodynie či spontánní bolesti); (Fenselau, Heinke et al. 2011).

Pomalý synaptický přenos umožňují metabotropní receptory. Excitačně v zadním rohu míšním působí glutamát či neuropeptidy typu CGRP a substance P, které aktivují receptory spřažené s trimerními G-proteiny (GPCR): Například glutamátové mGlu receptory I – III či neuronikinový receptor NK1 s vazebným místem pro substanci P (Woolf and Salter 2000). Následná kaskáda druhých posílů může vést k pomalé, až desítky sekund trvající depolarizaci postsynaptické membrány. Naproti tomu pomalý inhibiční přenos ovlivňuje zejména presynaptickou část míšních spojení, kde jsou exprimovány metabotropní $GABA_B$ receptory (Towers, Princivalle et al. 2000).

Na nociceptivní signalizaci mají vliv kromě neurotransmiterů také neuromodulátory, které se podílejí na facilitaci či atenuaci. K těmto modulátorům se řadí substance P, CGRP, ATP, cytokin $TNF\alpha$, oxid dusný NO, prostaglandiny, růstové faktory NGF,

GDNF a především z hlediska této práce klíčové endokanabinoidy a endovaniloidy (Millan 1999). Endokanabinoidy a endovaniloidy jsou pestrou skupinou látek, která ovlivňuje především presynaptickou část signalizace skrze TRPV1 a CB1 receptory exprimované na primárních aferentech (Binzen, Greffrath et al. 2006). Jejich účinky jsou často vzájemně antagonistické, avšak přesné mechanismy jejich působení na míšní úrovni nejsou dosud zcela vyjasněny (Spicarova, Nerandzic et al. 2014). Podrobněji se endovaniloidům věnuje kapitola „Endovaniloidy/endokanabinoidy“.

2.2 Fyziologie a patofyziologie bolesti

2.2.1 Typy bolestivých stavů

Bolest už ze své definice (Loeser and Treede 2008) zahrnuje celou řadu stavů s různou etiologií i délkou trvání a dalších hledisek. Bolest tak můžeme dělit na základě způsobu vzniku na nociceptivní, zánětlivou a neuropatickou bolest. Nociceptivní bolest vzniká poškozením či potenciálním poškozením tkáně, díky čemuž jsou drážděny nociceptory popsané v předchozí kapitole. Oproti tomu zánětlivý typ bolesti vzniká aktivací nociceptorů pomocí mediátorů zánětu vylučovaných ze zanícených měkkých tkání (Scholz and Woolf 2002). Zánětlivý typ bolesti nedoprovází pouze záněty způsobené poraněním či infekcí, ale může být příznakem ischemie či nádorového onemocnění. Neuropatickou bolest způsobuje přímé poškození nervových vláken, ať už poraněním či nemocí. Tento typ bolesti tak není doprovázen přímým drážděním nociceptorů, a má jiný mechanismus vzniku, což výrazně ztěžuje jeho léčení.

Vedle mechanismu vzniku lze také rozlišovat bolest na základě jejího místa vzniku: V rámci nervové soustavy rozlišujeme periferní bolest, tedy bolest v místě bolestivého podnětu, či centrální bolest vznikající díky poškození smyslových nervových drah v CNS. Z hlediska obecné anatomie je pak rozeznávána bolest somatická (například muskuloskeletární, kožní, bolest hlavy atd.) a viscerální (bolest útrobních orgánů).

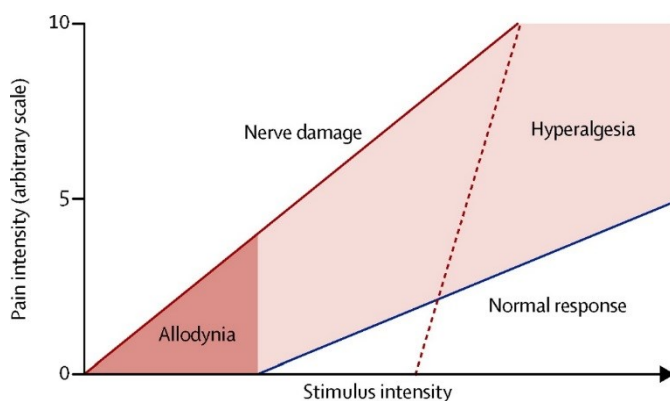
Zásadním aspektem pro rozlišení, zda je bolest patologická či nikoliv, je délka jejího trvání:

- Akutní bolest trvá sekundy a doprovází nociceptivní podnět (úraz, operace, choroba). Fyziologicky slouží k ochraně organismu před dalším poškozením, úniku ze stresové situace a napomáhá hojení.

- Subchronická bolest trvá v řádu hodin až dnů a objevuje se v průběhu zotavování poškozené tkáně. Po reparaci organismu obvykle vymizí.
- Chronická bolest přetrvává dlouhodobě – i déle než půl roku a sama o sobě může dále poškozovat tkáň (Millan 1999). Díky tomu lze chronickou bolest považovat za samostatné onemocnění a měla by být i takto léčena.

Bolest, ať už fyziologická či patologická, je často doprovázena dvěma jevy zvýšené citlivosti vůči podnětům, allodynii a hyperalgesií (Obrázek 2). Allodynie, dle definice IASP z r. 2008 (Loeser and Treede 2008), zahrnuje podněty neaktivující nociceptory, které jsou však vnímány bolestivě. Allodynie se vyskytuje i při běžném hojení (například spálená pokožka, která při dalším vystavení slunci pálí), ale může být také varovným příznakem různých chorob, zejména neuropatií (Sandkuhler 2009).

Jako hyperalgesie je popisován stav zvýšené odpovědi na bolestivý podnět. Primární hyperalgesie se vyskytuje přímo v místě poškození či podráždění nociceptoru. Vzniká senzitivizací primárních aferentů v místě poranění a částečně se na ní podílí i CNS. Senzitivizací dochází ke snížení prahu pro aktivaci receptorů na primárních aferentech. Podrobněji o senzitivizaci na periférii bude pojednávat kapitola „Patofyziologické bolestivé stavy – periferní zánět a neuropatická bolest“. V případě sekundární hyperalgesie se jedná o zvýšenou reakci na stimulaci nepoškozené tkáně v okolí poranění. Tento typ zvýšené citlivosti je zapříčiněn aktivací primárních nociceptorů s normálním prahem pro aktivaci v této tkáni, ale její rozvoj souvisí s centrální senzitivizací v míše a mozku.



Obrázek 2 Hyperalgesie a allodynie.

Modrá linie na obrázku znázorňuje normální odpověď na bolestivý podnět v kůži: Do určité míry jsou podněty nebolestivé a vyvolávají jen běžnou senzickou odpověď a teprve přivýšší intenzitě dochází k nociceptivní signalizaci. Červená nepřerušovaná čára ukazuje sílu odpovědi na podnět po poškození nervového zakončení. Míra allodynie a hyperalgesie se může lišit v závislosti na místě podnětu

v postižené oblasti u neuropatických pacientů. Na některých místech je odpověď na podnět posunuta doleva na grafu, tedy je potřeba nižší intenzita stimulu na vyvolání bolestivé odpovědi (červená nepřerušovaná čára). Naopak v místech se ztrátou citlivosti může docházet ke zvýšení prahu pro vyvolání bolestivé reakce (červená přerušovaná linie). Ale i v těchto oblastech nadprahové podněty mohou vyvolávat hyperalgesické odpovědi (Jensen and Finnerup 2014).

Hyperalgesie a allodynie se vyskytují u 15 – 50 % pacientů s neuropatickou bolestí. U některých poruch, jako je postherpetická neuralgie, bývá reportováno až 70 % pacientů

s allodynii (Jensen and Finnerup 2014). Oba tyto jevy jsou nejen součástí ochranných prvků nocicepce, ale i významným indikátorem rozvoje patologických bolestivých stavů.

2.2.2 Patofyziologické bolestivé stavy – periferní zánět a neuropatická bolest

Patologická bolest je často identifikována díky svému dlouhodobému trvání (chronická bolest), ale také příznakům neuropatické i zánětlivé bolesti. Poškození nervu může vést k rozvoji lokálního či celkového zánětu a díky tomu se neuropatická bolest stává zároveň zánětlivou. Analogicky, zánět může poškodit nervová zakončení a zánětlivá bolest získá prvky neuropatické bolesti.

Řada autorů poukazuje na zánětlivý původ neuropatické bolesti, neboť se na jejím rozvoji a udržení podílí mnoho prozánětlivých faktorů (McMahon, Cafferty et al. 2005; Campbell and Meyer 2006; Moalem and Tracey 2006). Během poranění tkání, včetně poškození nervů, se lokálně uvolňuje početná skupina prozánětlivých látek. Mezi ně patří prostaglandiny, substance P, volné radikály, histamin, ATP, adenosin a další. Také jsou exprimovány neutrofní faktory (NF) a cytokiny, jakým je například TNF α (podrobněji v kapitole „Nociceptivní úloha prozánětlivého cytokinu TNF α a napětově závislých Nav 1.3 a 1.8 kanálů v neuropatické bolesti“). Primární nociceptivní aferenty jsou díky působení části těchto látek senzitivizovány a po své aktivaci mohou samy uvolňovat řadu prozánětlivých faktorů, jako je substance P či CGRP, které dále atrahují buňky imunitního systému – makrofágy, neutrofile (Julius and Basbaum 2001). Nociceptory tak samy přispívají k rozvoji neurogenního zánětu. Za molekulární integrátor zánětlivých procesů na periferních nervových zakončeních bývá považován TRPV1 receptor (Cortright and Szallasi 2004), podrobněji popsán v sekci „Vaniloidní TRPV1 receptor“.

Rozvoj neuropatické bolesti je navíc provázen následujícími jevy (Bridges, Thompson et al. 2001; Ueda 2008):

1. Změny v expresi iontových kanálů – zejména TTX-senzitivní a TTX-rezistentní sodíkové kanály jak v místě poškození nervů, tak na míšní úrovni, dále také sodíkové kanály N typu. Tyto lokální změny přispívají k rozvoji hyperalgesie a allodynii. Atenuačně vůči těmto změnám pak mohou působit agonisté kanabionoidních receptorů¹ (CB1) (Bridges, Ahmad et al. 2001), kterým se podrobněji věnuje kapitola „Endovaniloidy/endokanabinoidy“.
2. Ektopické a spontánní výboje (akční potenciál).

3. Demyelinizace A β a A δ vláken a jejich efáze (někdy též efapse) - laterální spojení dvou nervových buněk, kdy signály mezi nimi jsou přenášeny přímo v tomto kontaktu membrán a ne přes synapsi (Mosby Inc. 2009).
4. Souběžné „pučení“ výběžků primárních aferentů – vznik nových synapsí mezi nimi, nahrazení poškozeného vlákna.
5. Efáze A δ a C vláken - podíl na efázi může mít i výše zmíněné pučení
6. Inervace DRG vláknů sympatických neuronů.
7. Wallerova degenerace – zánik distální části poškozeného axonu.

Na úrovni CNS se při neuropatické bolesti projevují změny jak v mozku, kde dochází ke kortikální reorganizaci, tak v míše. Mícha podléhá vlastní reorganizaci a klesá endogenní inhibiční aktivita neuronů (Bridges, Thompson et al. 2001; Meeus, Vervisch et al. 2012).

Vedle těchto jevů se také mění tzv. „activity-dependent slowing“ (ADS) u C vláken: ADS představuje zpomalení vedení nervového vzruchu na základě opakovaného dráždění nervového zakončení. To přímo ovlivňuje transmissi akčního potenciálu z C vláken na neurony v míšní lamině I. ADS je běžným jevem i za fyziologických podmínek, avšak při rozvoji periferního zánětu dochází k jeho oslabení a přispívá tak k rozvoji hyperalgesie (Gee, Lynn et al. 1996; Dickie, McCormick et al. 2017).

Při studiu neuropatické bolesti byly změny v ADS také pozorovány, ale v závislosti na použitém modelu docházelo ke snížení ADS, jako u diabetické neuropatie navozené streptozotocinem (Wang, Wang et al. 2016). Naopak, u mechanického modelu neuropatické bolesti (podvázání spinálních nervů – SNL) bylo popsáno zvýšení ADS u sousedících nepoškozených C vláken (Shim, Ringkamp et al. 2007). Přesné mechanismy stojící v pozadí ADS nejsou dosud zcela objasněny, ale dosavadní výzkumy se opírají především o změny koncentrace Na⁺ v axonu daného vlákna (Dickie, McCormick et al. 2017).

Klíčovým jevem je však tzv. centrální senzitivace, představující složitý komplex mechanismů přispívajících k rozvoji hyperalgesie a allodynie v patologických stavech bolesti.

2.2.3 Centrální senzitivace

Centrální senzitivace je dle IASP (2008) definována jako „zvýšená reaktivita nociceptivních neuronů v centrální nervové soustavě vůči prahovým či podprahovým vstupům z aferentů“. Na základě centrální senzitivace pak dochází u dalších primárních senzoričtých vláken, přenášejících původně jen taktilní podněty, ke změně fenotypu díky nově indukované expresi substance P na vlákna podobná nociceptivním (Sandkuhler 2009). Vzhledem k šíři tohoto tématu se tato dizertační práce zaměří především na aspekty míšní úrovně centrální senzitivace.

Změny přenosu na míšní úrovni jsou způsobeny dvěma hlavními mechanismy: Posttranslační modifikací receptorů, iontových kanálů a jejich regulačních proteinů – především jejich fosforylací pomocí řady proteinkináz PKA, PKC, p38 MAPK, Src, ERK, a CaMKII (Meacham, Shepherd et al. 2017). Dále se jedná o změnu exprese těchto proteinů v primárních aferentech i míšních neuronech, doprovázenou posunem v jejich internalizaci či naopak inkorporaci do buněčné membrány, zejména zabudování nových AMPA receptorů do postsynaptických membrán (Ji, Kohno et al. 2003). Během centrální senzitivace dochází ke zvýšenému výlevu glutamátu z excitačních zakončení, k čemuž přispívá aktivace presynapticky uložených TRPV1, NMDA a P₂X₃ receptorů, ale také nedávno popsaná zvýšená exprese VGLUT2, tedy vezikulárních glutamátových transportérů 2, v DRG a lamině I a II (Ji, Kohno et al. 2003; Wang, Wang et al. 2016). Významnou úlohu zastávají také prozánětlivé faktory exprimované gliemi i primárními aferenty, jako je substance P, CGRP, cyklooxygenáza prostaglandiny, TNF α a brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Tyto faktory působí v nocicepci na mnoha úrovních a dosud nejsou objasněny všechny aspekty jejich vlivu. Například BDNF vedle spuštění signální kaskády vedoucí k fosforylaci podjednotek NMDA receptorů, tedy jejich potenciaci (Hildebrand, Xu et al. 2016), také inhibuje presynaptické GABA_A receptory. Výsledkem inhibice GABA_A receptorů je tepelná hyperalgesie pozorovaná na modelu trvalého podvázání sedacího nervu (CCI) (Chen, Guo et al. 2014).

2.2.3.1 *Wind-up*

Zvýšení citlivosti (reaktivity) míšních nociceptorů podporují i krátkodobé mechanismy posilující synaptický přenos, mezi něž patří wind-up. Jedná se o nárůst počtu akčních potenciálů, způsobených homosynaptickou aktivitou, na neuronech zadních rohů míšních při opakované nízkofrekvenční stimulaci C-vláken. Tím pádem pouze aktivované synapse podléhají těmto změnám. Dochází k výlevu z excitovaných centrálních aferentů

glutamátu, ale i substance P a CGRP, které na postsynaptické membráně aktivují příslušné metabotropní receptory (Mendell 1984; Battaglia and Rustioni 1988). Signální kaskáda aktivována těmito receptory ústí v pomalou depolarizaci membrány, která uvolňuje hořčičový blok z NMDA glutamátových receptorů a dochází k časové sumaci vstupů. Tento proces zvyšuje pravděpodobnost akčního potenciálu a přispívá k rozvoji long-term potenciace. Wind-up se může podílet na vzniku sekundární hyperalgesie.

2.2.3.2 Homosynaptická a heterosynaptická facilitace

K posílení synaptické účinnosti nedochází pouze u nociceptivních vláken aktivovaných původním stimulem (homosynaptická facilitace, jakou je například wind-up), ale také na synapsích, které nebyly aktivovány původním podnětem (Simone, Baumann et al. 1989). V tomto případě, tzv. heterosynaptické facilitaci, je zejména zvýšena citlivost míšních neuronů na aktivitu nízkoprahových A β vláken, která patří mezi mechanosenzitivní senzorická vlákna a za normálních okolností se nepodílejí na nociceptivním přenosu. Díky tomu je aktivován vyšší počet neuronů, které se při stimulaci zapojují do nociceptivní signalizace. K heterosynaptické facilitaci přispívá vtok Ca²⁺ kationtů do buněk skrz NMDA kanály či přes napětově řízené Ca²⁺ kanály a pravděpodobně také efáze mezi A β a A δ vlákny a reorganizace na míšní úrovni (Bridges, Thompson et al. 2001).

2.2.3.3 Long-term potenciace (LTP) a long-term deprese (LDP)

Součástí centrální senzitivizace při rozvoji neuropatické bolesti je long-term potenciace na synapsích C vláken v míše. LTP znamená dlouhodobý nárůst synaptické síly, který však není nezvratitelný. Tento mechanismus byl popsán na hipokampu jako jeden z klíčových procesů učení a paměti (Bliss and Collingridge 1993). LTP v nocicepci má celou řadu společných jmenovatelů s LTP v hipokampu. V časně fázi LTP, kdy nedochází ještě k novotvorbě proteinů, narůstá intracelulární koncentrace vápníku (na úrovni zadního rohu míšního otevřením NMDA receptorů, Ca²⁺-napětově závislých kanálů, uvolněním vápníku z vnitrobuněčných zásob). To vede aktivaci kalmodulinu a následně Ca²⁺/kalmodulin-dependentní kinázy M II (CaMKII). Tato kináza fosforyluje AMPA receptory a zesiluje jejich aktivitu a podporuje jejich inzerci do postsynaptické membrány (Fang, Wu et al. 2002). V nociceptivní LTP hraje velmi důležitou úlohu substance P a jeho receptor NK1, který je společně s BDNF (receptor trkB) zásadní pro amplifikaci signálu z nociceptivních C-vláken exprimujících TRPV1 receptory, jak

ukázaly studie na zvířecích i lidských modelech (Zhou, Zhong et al. 2008; Zhou, Yang et al. 2011; Henrich, Magerl et al. 2015). Na presynaptické úrovni vede vtok vápníku k aktivaci dalších kináz (Erk, PKA, PKC, MAP kinázy ad.), díky čemuž dochází ke zvýšenému výlevu glutamátu a neuropeptidů z těchto zakončení.

V pozdní fázi LTP dochází ke změnám exprese genů díky aktivaci transkripčních faktorů CREB či p38 MAP, které nakonec mohou vést až ke změně fenotypu primárních sensorických neuronů (Ji, Samad et al. 2002; Campbell and Meyer 2006).

LTP potenciaci je možné vyvolat krátkodobou vysokofrekvenční stimulací C vláken, tedy homosynaptickou facilitací, či například působením cytokinu TNF α (Randic, Jiang et al. 1993; Liu, Zhou et al. 2007).

Po poškození či zánětu periferních nervových vláken dochází u inhibičních míšních neuronů k jevu opačnému vůči LTP, tzv. long-term depresi. Tento mechanismus je jednou z možných příčin poklesu aktivity těchto neuronů. Během LTD jsou internalizovány AMPA receptory ze synapsí, snižuje se počet GABA receptorů pre- i postsynapticky (Kohno, Moore et al. 2003). Na GABAergních míšních neuronech dochází k hyperpolarizaci membrány díky snížení počtu chlorido-draselných transporterů KCC₂. Jejich knock-out vede k hyperalgesii na modelu neuropatické bolesti (Coull, Boudreau et al. 2003).

2.2.3.4 Úloha glie v rámci centrální senzitivace

Centrální senzitivaci a LTP v míše provází aktivace a proliferace mikroglie a astrocytů. Glie jsou nezbytné pro vznik a udržení hyperalgesie provázející periferní zánět (Raghavendra, Tanga et al. 2004). Oba typy glií mohou být aktivovány látkami, jako glutamát, substance P, NO, prostaglandiny, ATP a další, vylučovanými z primárních aferentů či supraspinálních descendentních drah. Díky tomu pak mikroglie samy vylučují podobnou sadu látek (prostaglandiny, leukotrieny, TNF α , NO, glutamát, proteolytické enzymy). Dále dochází k expresi receptorů typu kanabinoidní receptor 2 (CB₂), chemotaktilní cytokinový receptor 2 (CCR) a MHC II – major histocompatibility complex typu II, které se mohou podílet na modulaci signalizace při patologických bolestivých stavech. Naproti tomu aktivované astrocyty mohou vychytávat menší množství glutamátu ze synapsí a přispívat tak k dalšímu posilování synaptického přenosu v míše (Sandkuhler 2009).

Soubor procesů centrální senzitivace představuje jednu z největších komplikací léčby patologických bolestivých stavů, neboť dává vznik nociceptivní signalizaci nezávislé na podnětech z primárních aferentů. Tento typ signalizace se navíc odehrává z větší části za hematoencefalickou bariérou, tudíž je nutné nejen důkladně pochopit mechanismy související s daným fenoménem, ale také vyvinout léčbu, která bude překonávat tuto fyziologickou překážku.

2.3 Molekulární mechanismy nocicepce

2.3.1 Vaniloidní TRPV1 receptor

Naklonování cDNA TRPV1 receptoru před téměř 20 lety znamenalo zásadní průlom pro studium molekulárních mechanismů bolesti (Caterina, Schumacher et al. 1997), především na úrovni periferie. Avšak i v rámci CNS a zejména v míše mají TRPV1 receptory svoji nezastupitelnou roli. Modulační účinky v zadních rozích míšních byly již popsány v řadě prací (Spicarova, Nerandzic et al. 2014), ale přesné mechanismy, kterými zde působí, jsou předmětem dalších diskuzí a výzkumů.

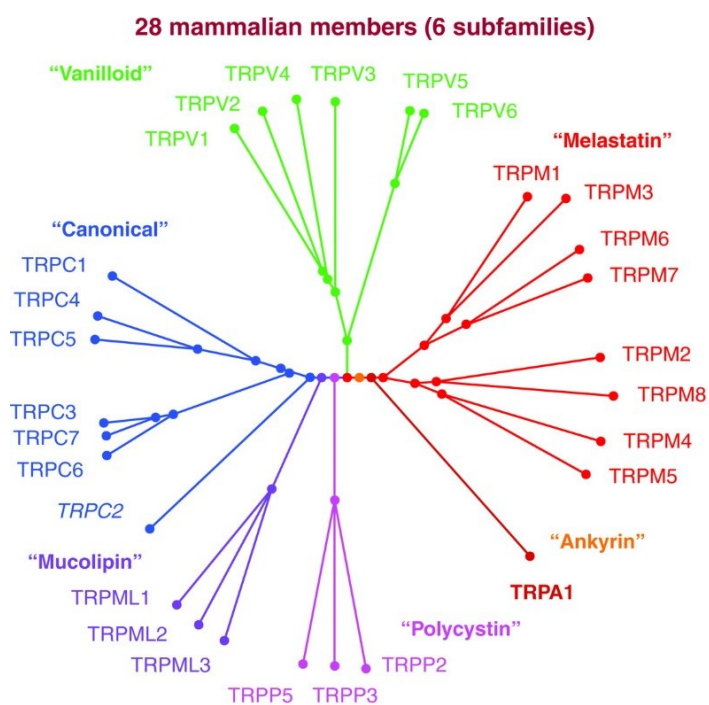
V rámci periferní nervové soustavy slouží TRPV1 receptory jako převodníky mezi nociceptivními podněty a vlastním nervovým signálem. Díky schopnosti odpovídat na rozličné typy podnětů fungují vaniloidní receptory 1 jako molekulární integrátory chemických a fyzikálních nociceptivních stimulů (Szallasi and Blumberg 1999; Caterina and Julius 2001). Mezi známé exogenní aktivátory TRPV1 receptorů, používané i k jejich studiu, patří kapsaicin a resiniferatoxin (RTX) ze sukulentu *Euphorbia resinifera* sdílející strukturní motiv kyseliny homovanilové (Szallasi and Goso 1994), který dal vzniknout jménu u této rodiny receptorů - vaniloidní.

Kromě kapsaicinu a resiniferatoxinu TRPV1 receptory mohou být na periférii aktivovány sníženým pH, teplotou vyšší než 43°C a také algogenními látkami, které se uvolňují v místě poranění – prostaglandiny, serotonin, bradykinin, substance P ad. Po aktivaci těmito látkami dochází k otevření TRPV1 kanálu a influxu hlavně vápenatých (Ca^{2+}) kationtů do nervového zakončení. V menší míře procházejí tímto neselektivním kanálem i další kationty, K^+ a Na^+ .

2.3.2 Struktura TRPV1 receptoru

Vaniloidní receptory 1 patří do velké rodiny TRP receptorů (transient receptor potential), neselektivních kationtových kanálů. Rodina TRP receptorů je podrobněji dělena dle homologické podobnosti na sedm podrodin – vizte Obrázek 3, fylogenetický strom savčích receptorů (Nilius, Owsianik et al. 2007). Řada receptorů nejen z vaniloidní podrodiny se také podílí na nocicepci a jsou podobně jako TRPV1 exprimovány v DRG neuronech. I proto je na ně v současné době zaměřen výzkum při hledání nových analgetik.

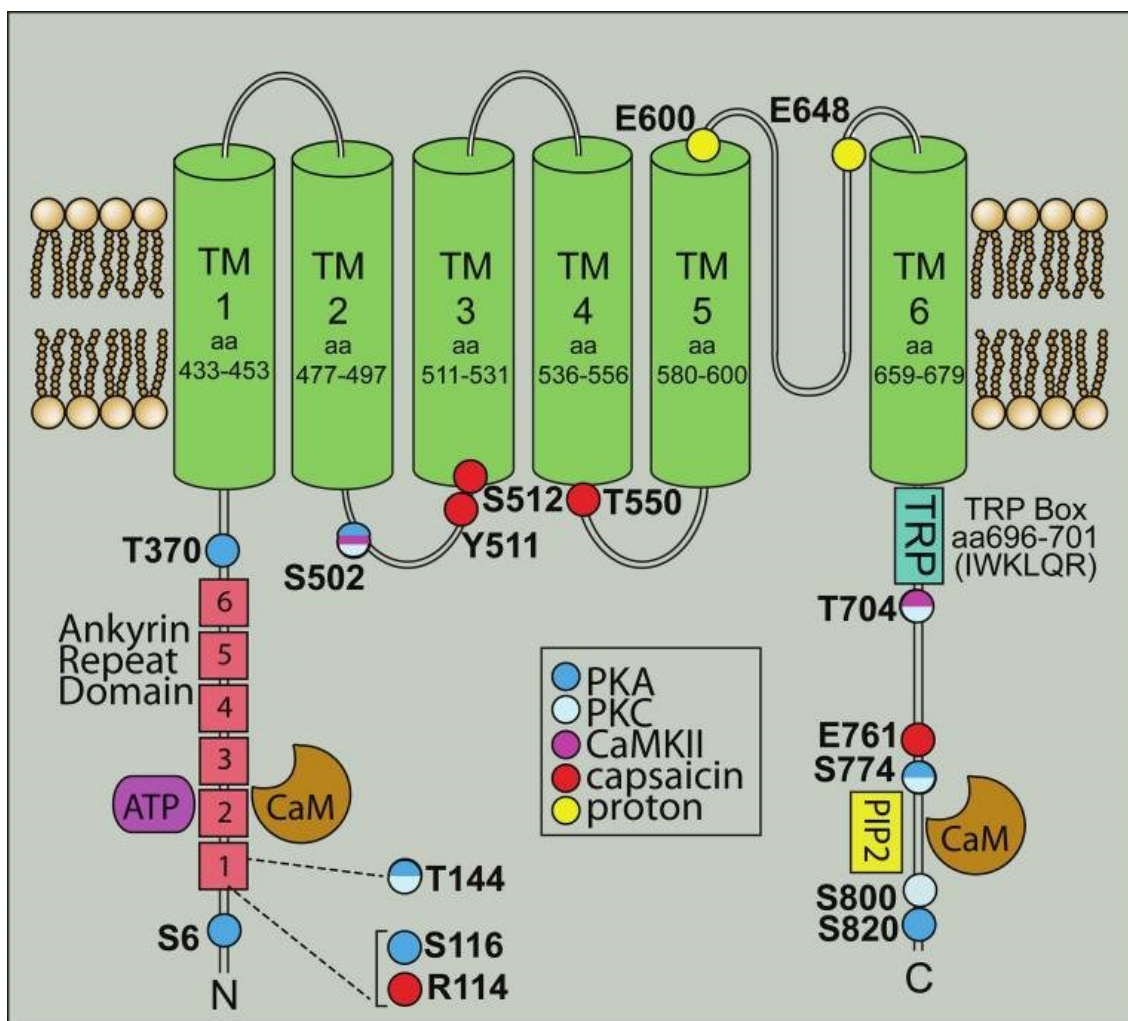
TRP receptory jsou tvořeny čtyřmi podjednotkami (homo- i heterotetramery), které obsahují šest transmembránových helixů (Smith, Gunthorpe et al. 2002). Mezi pátým a šestým helixem se nachází hydrofobní smyčka, tzv. poor loop tvořící v tetrameru pór pro průchod kationtů. Oba konce proteinu (N- a C-) se nacházejí v cytosolu (Astorga 2008). Na C-konci se nachází tzv. TRP box, který umožňuje vlastní tetramerizaci proteinu (Garcia-Sanz, Fernandez-Carvajal et al. 2004).



Obrázek 3 *Fylogenetický strom savčích TRP receptorů.* TRPC – kanonické receptory se vyskytují v mozku, srdci, varlatech, vaječnících, svalech anadledvinkách a napomáhají excitabilitě Purkyňových buněk. TRPM – melastatinové receptory jsou podobně široce rozšířené v savčích organismech jako TRPC a na rozdíl odkanonických TRP receptorů některé z nich jsou citlivé na teplotní změny. TRPV – vanilloidní receptory se hojně nacházejí v nociceptorech, mozku, játrech, močovém měchýři, slezině a dalších orgánech. Řada z nich je termosenzitivní vůči vyšším teplotám. TRPA – ankyrinové receptory jsou exprimovány

vláskovými buňkami ucha i DRG neurony. TRPP – polycystinové a TRPML – mucolipinové receptory patří mezi špatně charakterizované TRP receptory, jejichž společným znakem je extracelulární smyčka mezi prvním a druhým helixem (Gees, Colsoul et al. 2010); obrázek převzat z (Astorga 2008).

Kapsaicinový, TRPV1, receptor se běžně skládá jako homotetramer, přičemž jedna podjednotka obsahuje 838 AA o celkové molekulární hmotnosti 92 – 95 kDa (Caterina, Schumacher et al. 1997). Struktura TRPV1 receptoru je podrobněji ilustrována na schématu níže (Obrázek 4). Hydrofilní N-konec podjednotky představuje klíčovou oblast pro interakci s cytoskeletem (ankyrinové domény a oblasti bohaté na prolin) a také se zde nachází arginin R114, který představuje část vazebného místa pro kapsaicin.



Obrázek 4 Struktura TRPV1 receptoru. TRPV1 receptor se skládá ze šesti transmembránových (TM) domén s tzv. poor loop mezi pátou a šestou TM. Intracelulárně leží oba konce proteinu. N-konec obsahuje šest ankyrinových domén, které umožňují vazbu kalmodulinu a ATP. Obě látky významně moduluji aktivitu TRPV1 receptoru. Druhé vazebné místo pro kalmodulin se nachází na C-konci poblíž vazebného místa pro fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂). Na obou koncích i na některých transmembránových doménách se vyskytují vazebná místa pro další kinázy – PKA, PKC, CaMKII a také vazebná místa pro kapsaicin či protony. Zkratky na obrázku: TM = transmembránová; aa = aminokyselina; CaM = kalmodulin; PIP₂ = fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát; PAK = proteinkináza A; PKC = proteinkináza C; CamKII = Ca²⁺/kalmodulin dependentní kináza (Ho, Ward et al. 2012).

Funkčně velmi významnou část naopak tvoří kratší C-konec. Kromě přítomnosti TRP boxu se zde nacházejí fosforylační místa pro proteinkinázy (PKC, c-AMP závislá proteinkináza PKA, CaMK-II), senzitivizující tento receptor. Defosforylačně působící fosfatázy (kalcineurin) naopak umožňují desenzitizaci skrze konformační změny TRPV1 kanálu. Dále se na této části podjednotky vyskytuje tzv. Walker motif, který vytváří vazebná místa pro ATP a PIP₂. C-konec se také zásadním způsobem podílí na citlivosti vůči mnoha podnětům a tedy i možnosti aktivace či deaktivace kanálu. Zkrácením C-konce klesá práh teplotní aktivace, při odebrání poloviny AA z C-konce klesá také

citlivost vůči pH, kapsaicinu i změně membránového potenciálu (Vlachova, Teisinger et al. 2003).

2.3.3 Nociceptivní úloha TRPV1 receptoru

2.3.3.1 Senzitizace a aktivace TRPV1 receptorů

TRPV1 receptor je exprimován nociceptivními C a A δ vlákny na periferních zakončeních i na presynaptických zakončeních v míše. Na volných periferních zakončeních tento receptor mohou aktivovat či senzitizovat nejen endogenní látky, ale také exogenní podněty a fyzikálně-chemické změny prostředí. Typickým aktivátorem TRPV1 receptorů představuje zvýšení teploty nad 43°C, který je teplotním prahem pro vnímání bolestivých podnětů. Změna teploty přispívá také ke změně citlivosti vaniloidního receptoru vůči membránovému napětí. Podobně může působit i celá řada endogenních látek, díky čemuž i malá změna membránového napětí receptoru (např. depolarizace) může způsobit otevření tohoto receptoru-kanálu (Nilius, Owsianik et al. 2007).

Dalšími možnostmi aktivace TRPV1 receptorů jsou již zmíněné exogenní agonisté kapsaicin a resiniferatoxin či snížení pH. Lokální acidosa (pH cca 6.8) je jedním z průvodních jevů zánětu, poranění tkáně či její ischemie a zvyšuje citlivost TRPV1 receptorů vůči jiným agonistům. Při poklesu pH pod 6.0 je tento receptor aktivován vodíkovými kationty přímo (Tominaga, Caterina et al. 1998). Během zánětu či poranění tkáně je vylučována celá řada látek, které mohou samy otevírat TRPV1 kanál, zvyšovat expresi tohoto receptoru a jeho inkorporaci do plazmatické membrány či měnit citlivost vůči jiným podnětům (například teplotě). Mezi takové mediátory zánětu patří bradykinin, TNF α , prostaglandiny, ATP, insulin a nervový růstový faktor (NGF), receptory aktivované proteázami 2 (PAR2), artemin a další (Tominaga, Wada et al. 2001; Sugiura, Tominaga et al. 2002; Spicarova and Palecek 2010; Ikeda-Miyagawa, Kobayashi et al. 2015; Mrozkova, Palecek et al. 2016). Díky jejich působení jsou skrze sekundární posly aktivovány proteinkinázy (c-AMP závislá PKA, CaMKII, tyrosinkináza, PKC, MAPK, fosfatidyl-inositol-3 kináza – PI3K) fosforylující či počet vystavených TRPV1 receptorů, což mění kinetiku a citlivost TRPV1 receptoru vůči agonistům (Rathee, Distler et al. 2002; Zhang, Huang et al. 2005; Hensellek, Brell et al. 2007; Jeske, Patwardhan et al. 2009). Proteinkinázy PKA, PKC společně s fosfatázou kalcineurinem, fosfolipázou C a dalšími modulačními prvky jsou navázány na TRPV1 receptor přes AKAP, proteinkinázu A vázající protein. AKAP tvoří opěrné lešení u vnitřní strany membrány

pro tyto proteiny a zprostředkovává modulaci TRPV1 receptoru mediátory zánětu – prostaglandinem E2 a bradykininem (Zhang, Li et al. 2008).

Vzhledem k tomu, že vaniloidní receptor je propustný také pro Ca^{2+} , tak vlastní aktivace TRPV1 receptoru přispívá k aktivaci na Ca^{2+} -kalmodulinu závislé proteinkinázy. To vede k další senzitivizaci TRPV1. Navíc změna koncentrace vápenatých iontů přispívá k depolarizaci membrány, což může vyvolat až vznik akčního potenciálu. Fosforylace různými kinázami tak představuje klíčový mechanismus vnitřní aktivace a senzitivizace TRPV1 receptoru vůči jiným podnětům. Následkem těchto změn dochází k rozvoji hyperalgesie či allodynie (Oseguera, Islas et al. 2007). Nárůst koncentrace Ca^{2+} v buňce spouští také řadu signálních kaskád. Ty vedou k výlevu substance P a CGRP (calcitonin-related peptide), které výrazně přispívají k rozvoji neurogenního zánětu (Szallasi and Blumberg 2007).

V aktivaci TRPV1 receptorů hrají významnou úlohu i lipázy, substráty i produkty těchto enzymů. Bradykinin skrze svůj receptor B2 aktivuje fosfolipázu A_2 v kožních nociceptorech, která uvolňuje z membrány kyselinu arachidonovou. Ta je substrátem lipooxygenáz tvořících aktivátory TRPV1 receptorů, mezi něž patří kyseliny hydroperoxyeikosatetraenové (12-HPETE, 15-HPETE) a kyseliny hydroxyeicosatetraenové (5-HETE, 15-HETE); (Hwang, Cho et al. 2000).

Druhou aktivovanou fosfolipázou skrze bradykininový receptor B2 je fosfolipáza C. Jejím působením z fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP_2) vzniká diacylglycerol (DAG) nezbytný pro aktivaci proteinkinázy C (Ferreira, da Silva et al. 2004). PIP_2 slouží nejen jako substrát PLC, ale sám o sobě je modulatorem TRPV1 receptorů. PIP_2 se může vázat na řadu aminokyselinových zbytků vaniloidního receptoru, na nichž znemožňuje vazbu dalším látkám – PKC – či kalmodulinu bez Ca^{2+} a podle některých autorů tonicky blokuje aktivitu TRPV1 receptoru (Chuang, Prescott et al. 2001; Grycova, Holendova et al. 2012). Působení fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu na TRPV1 receptor je popisováno různými autory ambivalentně, tedy inhibičně i aktivačně v závislosti na intenzitě stimulu a použité metodologii (Lukacs, Thyagarajan et al. 2007; Yao and Qin 2009). Oproti tomu je jednoznačně vnímána aktivizační úloha ATP. Aktivací vlastních metabotropních receptorů dochází k fosforylaci TRPV1 receptorů přes PKC. Zároveň se intracelulární ATP váže přímo na tento receptor, kde kompetuje o místo s inhibičně působícím kalmodulinem s navázaným Ca^{2+} . Vazba ATP naopak způsobuje senzitivizaci vaniloidního receptoru a udržení odpovědi vůči exogenně podanému kapsaicinu. Nedochází tak

k desenzitizaci TRPV1. Zda převládne senzitivace pomocí ATP, či desenzitizace pomocí Ca^{2+} -kalmodulinu, závisí na poměrech intracelulárních koncentrací mezi těmito látkami (Tominaga, Wada et al. 2001; Lishko, Procko et al. 2007).

2.3.3.2 Desenzitizace TRPV1 receptoru a analgetické účinky kapsaicinu

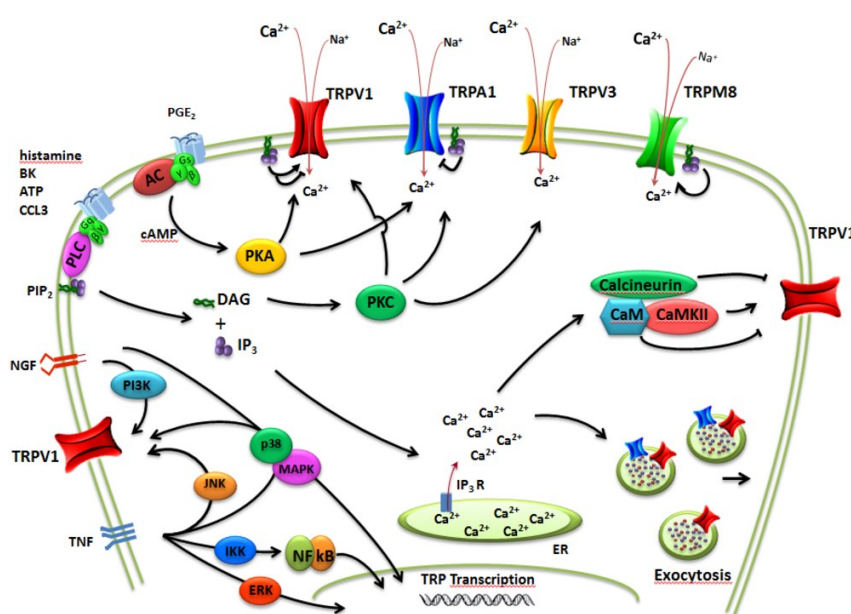
Desenzitizace, neboli snížení citlivosti vůči agonistům, je způsobena konformačními změnami daného receptoru či kanálu. Desenzitizace může být dočasná či trvalá. Účelem desenzitizace je chránit buňku před poškozením vyplývajícím z příliš masivní či dlouhodobé aktivace, jak lze ukázat na příkladu TRPV1 receptorů aktivovaných kapsaicinem již po 20 sekundách aplikace (Touska, Marsakova et al. 2011). Kapsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-monoamid) a jeho analogy (RTX) jsou silně lipofilní molekuly, které díky alifatickému řetězci vážou k intracelulárnímu C- a N-konci a oktanylovým řetězcem k hydrofobní poor-loop (podrobněji v kapitole „Struktura TRPV1 receptoru“). Kapsaicin otevírá TRPV1 kanál preferenčně pro Ca^{2+} ionty, jejichž příliš vysoká koncentrace neuronům škodí. Avšak iniciální vtok Ca^{2+} vede k aktivaci na vápníku závislé fosfatázy kalcineurinu (navázanému na AKAP), která defosforyluje TRPV1 a snižuje aktivitu tohoto kanálu (Zhang, Li et al. 2008). Desenzitizačně také působí Ca^{2+} díky vazbě na kalmodulin. Ca^{2+} -kalmodulin blokuje vazbou na C- i N-konci místa pro řadu kináz – Src, PKC a c-AMP dependentní PKA (Lishko, Procko et al. 2007). Defosforylace TRPV1 receptoru vede ke konformačním změnám, které umožňují desenzitizaci přetrvávat delší dobu (>20 minut); (Mohapatra and Nau 2003). Podobným způsobem účinkují také analogy kapsaicinu – kapsazepin (antagonista TRPV1), piperin či vaniloidy, kterým bude věnována kapitola „Endovaniloidy/endokanabinoidy“.

Dlouhodobá aktivace TRPV1 receptorů kapsaicinem však může vést až k degeneraci TRPV1 pozitivních C-vláken, což ve svém důsledku má dlouhodobý analgetický účinek v místě aplikace kapsaicinu (Simone, Baumann et al. 1989; Pospisilova and Palecek 2006). Tento jev je přisuzován právě cytotoxické koncentraci Ca^{2+} v cytosolu a mitochondriích, kdy jsou aktivovány Ca^{2+} -selektivní proteázy (Caterina, Schumacher et al. 1997; Caterina and Julius 2001). Analgetický účinek kapsaicinu a některých jeho analogů je využíván v klinické praxi pro lokální útlum bolesti, v podobě náplastí, gelů, krémů či mastí (Haanpaa and Treede 2012). Poměrně nedávná klinická studie na zdravých lidských dobrovolnících ze stejné laboratoře ukázala, že blokováním pomocí kapsaicinu TRPV1-pozitivních C-vláken dochází navíc ke snížení celkové bolesti, ale

i průvodních jevů – sekundární hyperalgesie a homo- i heterotopické LTP (Henrich, Magerl et al. 2015).

2.3.3.3 Role periferních TRPV1 receptorů – souhrn

TRPV1 receptory exprimované na periferních terminálách nociceptorů slouží jako molekulární integrátory bolesti. Díky jejich aktivaci a modulaci dochází k řadě změn, které mohou vést k signalizaci do CNS, ale také k periferní senzitivizaci vlastního zakončení. Senzitivizace probíhá nejen fosforylací TRPV1 receptoru, ale také zvýšenou expresí a inkorporací tohoto receptoru do membrány (Patapoutian, Tate et al. 2009). Na transdukcii nociceptivního podnětu do elektrického signálu se podílejí i další receptory z rodiny TRP kanálů. Podrobně tyto změny popisuje Obrázek 5 níže.



Obrázek 5 Přehled TRPV1 signálních drah. TRPV1 receptory nefungují pouze jako iontové kanály, ale také mohou zvyšovat excitabilitu neuronu skrze řadu signálních drah. Na periferii umožňuje TRPV1 transdukcii nociceptivního podnětu (bolestivé teplo, bolestivý mechanický podnět) do elektrického stimulu – akčního potenciálu. S ním se na tom podílejí i další receptory z TRP rodiny,

zejména TRPA1, ale i TRPV3 a TRPM8 (Patapoutian, Tate et al. 2009). Na modulaci aktivity se podílejí následující látky a receptory: TNF α a jeho receptor TNFR1, který aktivuje celou řadu drah – IKK, ERK, které ovlivňují transkripci genu pro TRP kanály. Dále se zapojují přímo do fosforylace TRPV1 receptoru přes JNK a p38-MAP kinázovou dráhu. Přes PI3K je TRPV1 receptor senzitivizován neurotrofním růstovým faktorem (NGF). Vaniloidní receptor je také fosforylován po aktivaci příslušných GPCR receptorů bradykininem (BK), chemokinu CCL3, ATP či histaminu. Ty také aktivací PLC přispívají k uvolnění vápníku z intracelulárních zásob endoplazmatického retikula (ER). Intracelulární nárůst Ca^{2+} umožňuje vystavení nových TRPV1 a TRPA receptorů na povrch neuronu (exocytóza), čímž je také zvýšena citlivost vůči dalším podnětům. Vápník také ovlivňuje calcineurin, fosfatázu, která naopak tlumí aktivitu TRPV1 receptoru společně s kalmodulem. Proti tomu působí na CaMKII – na Ca^{2+} závislá kalmodule kináza. Obrázek převzat z (Fernandez-Carvajal, Fernandez-Ballester et al. 2011).

Vzrůst exprese při periferní senzitivizaci se však týká pouze zánětu nebo poranění tkáně, nikoliv však poškození axonu (neuropatická bolest). Zde naopak exprese TRPV1 kanálu klesá. V případě neuropatického stavu dochází i k atrofii poškozeného nervového vlákna.

Vedlejší, neporaněná vlákna vykazují zvýšenou expresi TRPV1, který je anterogradně transportován do periferního zakončení (Fukuoka, Kondo et al. 2001). Tento jev může souviset s rozvojem a přetrváváním neuropatické bolesti. Senzitizace, aktivace a nárůst počtu TRPV1 receptoru na periférii zásadním způsobem přispívá k rozvoji primární i sekundární hyperalgesie a allodynie.

2.3.3.4 Úloha TRPV1 receptorů v synaptickém přenosu zadního rohu míšního

Funkce vaniloidních receptorů na míšní úrovni (a CNS) v nocicepci stále nabízí řadu nezodpovězených otázek, přestože jsou intenzivně studovány již řadu let (Spicarova, Nerandzic et al. 2014). Na míšních zakončeních nociceptivních A δ a C vláken se nacházejí TRPV1 receptory, exprimované v těle příslušných neuronů v DRG (Guo, Vulchanova et al. 1999; Valtschanoff, Rustioni et al. 2001). Jejich aktivace indukuje výlev glutamátu, substance P a CGRP z těchto terminál, čímž přispívá k excitačnímu nociceptivnímu přenosu v míše (Zhou, Chen et al. 2009). Terminály tvoří preferenčně synapse s projekčními neurony exprimujícími glutamátové NMDA a AMPA receptory v kombinaci s NK1 receptory pro substanci P v lamině I (Hwang, Burette et al. 2004). Ty jsou součástí monosynaptické signální dráhy vedoucí do vyšších pater CNS, konkrétně parabrachiálních jader mozkového kmene, jak naznačují pokusy imunochemického barvení a retrogradního značení neuronů těchto jader (Hwang, Burette et al. 2003).

Výlev glutamátu také zpětnovazebně ovlivňuje presynaptické TRPV1 receptory. V tělech nociceptivních senzoričkových neuronů v DRG jsou exprimovány mGluR1 a mGluR5 receptory, spřažené s trimerními G proteiny. Ty spouštějí signální kaskády aktivující PLC, PKC, PI-3K, MEK a MAP kinázu (Masuoka, Kudo et al. 2016). Tyto enzymy jsou součástí signálních kaskád, které krátkodobě i dlouhodobě posilují vliv TRPV1 receptorů na nociceptivní signalizaci. Masuoka a kolegové ukázali, že stimulace DRG neuronů po dobu 4 hodin glutamátu vede k nárůstu exprese TRPV1 receptorů díky aktivaci mGluR1 a podílí se tak na rozvoji tepelné hyperalgesie (Masuoka, Kudo et al. 2016). Ke zvýšení exprese TRPV1 receptorů na periférii i na centrálních zakončeních primárních aferentů dochází i po navození periferního zánětu (Ji, Samad et al. 2002; Ikeda-Miyagawa, Kobayashi et al. 2015). Na míšních synapsích je zvýšená aktivita a exprese TRPV1 receptorů asociována s rozvojem mechanické allodynie (Cui, Honore et al. 2006).

Aktivace TRPV1 receptorů a následný výlev glutamátu z primárních aferentů také heterosynapticky ovlivňuje inhibiční GABAergní a GABA/glycinergní neurony z laminy

II. Primární aferenty totiž tvoří synapse s interneurony, které jsou glutamát excitovány a do synapsí s inhibičními neurony uvolňují tentýž neurotransmitter. Zde glutamát působí na své metabotropní receptory (mGluR II a III). Díky aktivaci mGluR II a III se snižuje výlev inhibičního neurotransmiteru GABA, což může přispívat k zesílení bolestivého vjemu a rozvoji hyperalgesie či allodynie (Zhou, Zhang et al. 2007). Na druhou stranu, přímým působením kapsaicinu na synapsi inhibičních GABAergních neuronů z laminy II dochází k nárůstu inhibičních postsynaptických proudů (IPSC). Tento efekt je však pravděpodobně závislý především na uvolňování substance P a přítomnosti NK1 receptorů na postsynaptické membráně a nikoliv na výlevu glutamátu ze zakončení (Ferrini, Salio et al. 2007; Zhou, Zhang et al. 2007).

Elektrofyzilogická měření ukázala, že stimulace TRPV1 receptorů na primárních aferentech vede k výlevu glycinu z inhibičních neuronů v lamině II. Tato negativní zpětná vazba je zprostředkována postsynaptickými ionotropními glutamátovými receptory (AMPA, NMDA) a tlumí nociceptivní transmissi v míše (Zhou, Zhang et al. 2008).

Kromě centrálních zakončení primárních aferentů jsou vaniloidní receptory 1 exprimovány též astrocyty a mikroglie v míše (Doly, Fischer et al. 2004; Kim, Kim et al. 2006), což hraje důležitou roli v jejich aktivaci při zánětlivých a neuropatických bolestivých stavech. Otevření TRPV1 receptoru v gliích spouští Ca^{2+} dependentní apoptózu (Kim, Kim et al. 2006; Amantini, Mosca et al. 2007), ale zároveň při vypnutí genu pro expresi TRPV1 receptoru ($\text{TRPV1}^{-/-}$) v modelech neuropatické a zánětlivé bolesti došlo k výrazně menšímu nárůstu aktivovaných astrocytů a mikroglíí (Chen, Willcockson et al. 2009).

Mikroglie, stimulované výlevem například ATP, CGRP či substance P z primárních aferentů (na čemž se podílejí presynaptické TRPV1 receptory), exprimují mediátory zánětu, jako jsou interleukiny či cytokiny (Scholz and Woolf 2007). Podobným způsobem může k hypersenzitivitě přispívat i chemokin CCL2, který přes příslušný receptor CCR2 zvyšuje expresi TRPV1 receptoru a sodíkového kanálu $\text{Na}_v1.8$ klíčových pro přenos nociceptivní informace (Kao, Li et al. 2012). CCL2 je exprimován v aktivovaných astrocytech i neuronech dorsálních ganglií společně s TRPV1 receptory. Upregulace CCL2 se podílí na rozvoji centrální senzitivizace v modelech neuropatické bolesti (Gao, Zhang et al. 2009), který lze částečně zablokovat podáním selektivního antagonisty TRPV1 receptorů SB366791 (Spicarova, Adamek et al. 2014).

Společně s TRPV1 receptory jsou na presynaptických zakončeních také exprimovány prozánětlivé PAR2 receptory, jejichž aktivace na periférii vyvolává tepelnou i mechanickou hyperalgesii (Vergnolle, Bunnett et al. 2001), zprostředkovanou řadou signálních kaskád, které mohou vést také k senzitivizaci TRPV1 receptoru – aktivací PKC, PLC ad. To podporují nedávno publikované behaviorální a elektrofyziologické experimenty s antagonisty TRPV1 receptoru a PKC (Mrozkova, Spicarova et al. 2016).

Zásadní úlohu, častěji popisovanou v opozici k pronociceptivním TRPV1 receptorům, hrají kanabinoidní receptory 1, CB1. Sdílejí s vaniloidním receptory endogenní agonisty, a také místa exprese v nociceptivních neuronech a dalších buňkách (Ahluwalia, Urban et al. 2000; Alkatis, Solorzano et al. 2010). Podrobněji o jejich struktuře a roli a možné kooperaci s TRPV1 receptory pojednávají následující kapitoly.

Popis úlohy TRPV1 receptorů v míše a na periférii zcela jistě není vyčerpávající, což vyplývá nejen z „multifunkčnosti“ a „centrálnosti“ TRPV1 jakožto molekulárního integrátoru nociceptivních podnětů, ale také díky mnoha otázníkům, které jsou či budou předmětem dalších výzkumů, jakož i tématem této dizertační práce.

2.3.4 Kanabinoidní CB1 receptor

Kanabinoidní receptor CB1 se řadí mezi receptory spřažené s trimerními G-proteiny (GPCR). Poprvé bylo jeho cDNA naklonováno již v roce 1990 (Gerard, Mollereau et al. 1990; Matsuda, Lolait et al. 1990). Tento receptor je široce exprimován v nervové soustavě a především jeho úloha v řadě oblastí mozku, od amygdalu až po kortex koncového mozku, je již řadu let studována a popsána, neboť skrze CB1 receptor působí Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) a další podobné deriváty z marihuany (Kano, Ohno-Shosaku et al. 2009). CB1 receptor ovlivňuje paměťové procesy, chování (úzkost), zpracování sluchových stop a další, přičemž jeden z hlavních mechanismů představuje LTD indukovaná aktivací CB1 receptorů (Gerdeman, Ronesi et al. 2002).

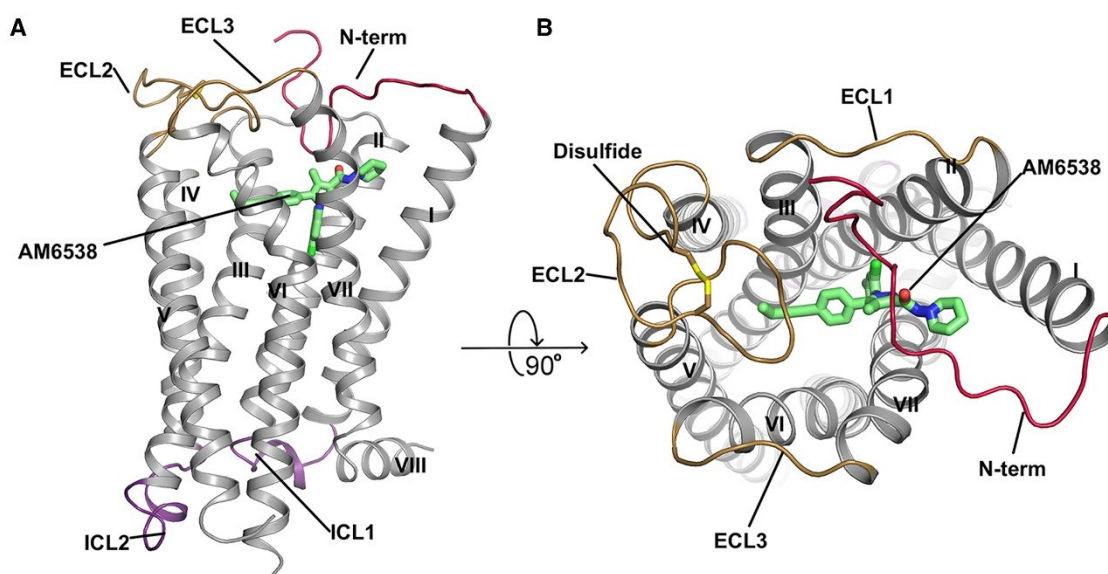
Kanabinoidní receptory jsou exprimovány také v oblastech klíčových pro nocicepci: Neuronech DRG, zadním rohu míšním, ventromediálních jádrech mozkového kmene a periaqueductální šedi (Tsou, Brown et al. 1998; Sanudo-Pena, Strangman et al. 1999). Analgetické účinky marihuany, respektive Δ^9 -THC, byly popsány již před více než 40 lety (Bicher and Mechoulam 1968; Kosersky, Dewey et al. 1973). Pozdější studie ukazují přímé antinociceptivní působení CB1 receptoru (Hohmann, Martin et al. 1995; Hohmann, Tsou et al. 1998; Pertwee 2001). Tyto receptory jsou však silně ovlivněny

rozvojem patologických bolestivých stavů a jejich funkce v nociceptivní signalizaci při těchto změnách není zdaleka objasněna. Podrobněji se tomuto tématu věnuje kapitola „Úloha CB1 receptoru“.

2.3.4.1 *Struktura CB1 receptoru*

CB1 receptor patří společně s CB2 receptorem, vyskytujícím se převážně na imunitních buňkách, mezi GPCR. Pro kanabinoidní receptor je typická velmi vysoká homologie aminokyselinové sekvence o 473 AA mezi jednotlivými savčími druhy (Kano, Ohno-Shosaku et al. 2009). CB1 receptor se sestává ze sedmi transmembránových helixů s N-koncem na extracelulární straně membrány a C-koncem v cytosolu (Bramblett, Panu et al. 1995). C-konec je klíčový pro vazbu na trimerní G-proteiny s α podjednotkou $G_{i/o}$ inhibující c-AMP cyklázu a tím pádem přímo ovlivňuje řadu signálních kaskád závislých c-AMP (Hampson, Evans et al. 1995). Někteří autoři však poukazují na to, že molekulární otisk styku mezi trimerními G-proteiny a GPCR je příliš velký na jediný receptor a ve skutečnosti mohou interagovat pouze v případě, že GPCR tvoří dimer (George, O'Dowd et al. 2002; Oldham and Hamm 2008). To podporují i studie provedené na CB1 receptorech, které navrhují možnost tvorby homodimeru s dalším CB1 receptorem či heterodimeru s jinými receptory, včetně opioidních (Wager-Miller, Westenbroek et al. 2002; Mackie 2005). Experimenty na buněčných kulturách naznačují možnost párování CB1 receptoru nejen s inhibičním G_{α} podjednotkou, ale také se stimulační G_{α_s} (Glass and Felder 1997; Bonhaus, Chang et al. 1998; Felder, Joyce et al. 1998). Poměr mezi $G_{i/o}$ a G_{α_s} , popřípadě i G_{α_q} , proteinu ve vazbě s CB1 může mít výrazný vliv na způsob modulace nociceptivní signalizace, které bude věnována následující kapitola.

V nedávné době byl CB1 receptor úspěšně krystalizován ve vazbě se svými ligandy a mohla tak být přesněji popsána vazebná místa pro endogenní i exogenní agonisty (Hua, Vemuri et al. 2016; Shao, Yin et al. 2016). Mezi klíčové struktury receptoru patří extracelulární N-konec, extracelulární smyčka mezi druhým a třetím helixem (ELC-2) a helixy III, VI a VII (Hua, Vemuri et al. 2016). Podrobněji vše ilustruje Obrázek 6. N-konec a ELC-2 tvoří ortosterickou kapsu, do níž se ligand váže. Právě blokování této kapsy se zdá být klíčové pro funkci exogenních antagonistů, jako tarabant či rimonabant (Shao, Yin et al. 2016).



Obrázek 6 Struktura CB1 receptoru a vazba ligandu AM6538. AM6538 je derivát běžně používaného antagonisty AM251; AM6538 oproti ostatním ligandům se váže pevnou vazbou na CB1 receptor a umožňuje tak krystalizaci a vizualizaci vazby mezi touto látkou a CB1 receptorem. (A) Boční zobrazení komplexu CB1 receptoru s navázaným AM6538. Receptor představují šedé stuhy transmembránových domén I – VII, spojené intra- a extracelulárními smyčkami (ICL 1 a 2 – fialové; ECL2 a 3 – okrové). Ligand AM6538 je zobrazen zeleně, vymezující vazebnou kapsu, kterou částečně uzavírá smyčka na N-konci receptoru (zobrazena rudě). (B) Komplex CB1-AM6538 – zobrazení shora. Významnou roli pro vazbu ligandu a uzavření ortosterické kapsy hrají disulfidické můstky mezi cysteinovými zbytky v ELC2 (žluté). Na základě tohoto modelu byla predikována vazebná místa pro další ligandy – THC, rimonabant, taranabant, anandamid či 2-arachidonoylglycerol (2-AG), které ale bude třeba potvrdit v dalších studiích zaměřených přímo na tyto látky (Hua, Vemuri et al. 2016).

2.3.4.2 Úloha CB1 receptoru v nocicepci

Kanabinoidní receptory 1 jsou exprimovány na nociceptivních C a A δ neuronech společně s NGF a CGRP (Ahluwalia, Urban et al. 2000; Ahluwalia, Urban et al. 2002; Veress, Meszar et al. 2013). Experimenty na knockout myších (CB1 $^{-/-}$) prokázaly, že CB1 receptory mají signifikantní antinociceptivní vliv, jak při celkové, tak lokální delecí genů pro tento receptor na periférii (Ledent, Valverde et al. 1999; Agarwal, Pachet et al. 2007).

Dosud známá role kanabinoidních receptorů v nocicepci spočívá v několika hlavních mechanismech:

- Modulace napětově závislých K $^{+}$ Kv1.4 kanálů na periférii, která snižuje množství AP v nociceptivních neuronech (Binzen, Greffrath et al. 2006).
- Inhibice vstupu vápenatých iontů do buňky. Důsledkem této inhibice může být nižší výlev excitačních neurotransmiterů na úrovni míchy či modulace některých signálních kaskád:
 - Inhibice napětově závislých Ca $^{2+}$ kanálů (Pertwee 2006).

- Inhibice Ca^{2+} proudů aktivovanými TRPV1 receptory na DRG neuronech (Sagar, Kelly et al. 2005; Khasabova, Khasabov et al. 2008).
- Aktivace MAPK a ERK dráhy (Howlett, Blume et al. 2010).
- Změna exprese CB1 receptorů při zánětu či rozvoji neuropatické bolesti (Lim, Sung et al. 2003; Amaya, Shimosato et al. 2006; Alkaitis, Solorzano et al. 2010; Palazzo, Luongo et al. 2012).

2.3.4.3 Signální kaskády aktivované CB1 receptory

Z hlediska úlohy těchto receptorů je významný překryv především s expresí TRPV1 receptorů a draselných napěťově závislých kanálů Kv1.4 na periferních i míšních terminálech těchto vláken, které mohou být ovlivňovány aktivací CB1 receptoru (Binzen, Greffrath et al. 2006). Anandamidem (AEA), svým endogenním agonistou, aktivované CB1 receptory blokují adenylyl cyklázu – přes $G\alpha_i$ z trimerního G-proteinu, což vede k poklesu koncentrace c-AMP a následnému snížení aktivity c-AMP závislé PKA (Howlett and Mukhopadhyay 2000). Tato kináza fosforyluje Kv1.4 kanál, čímž zpomaluje jeho inaktivaci a následnou repolarizaci. Fosforylace Kv1.4 kanálu přispívá k repetitivní tvorbě akčního potenciálu („repetitive firing“) na periférii, a k uvolňování neurotransmiteru na centrálních zakončeních. Blokováním PKA potlačují aktivované CB1 receptory tuto aktivitu a udržují Kv1.4 kanály otevřené, tedy na nociceptivních neuronech mohou působit atenuačně (Binzen, Greffrath et al. 2006). Vedle toho může mít potlačení c-AMP PKA aktivity vliv na senzitivizaci TRPV1 receptoru, neboť vaniloidní receptor obsahuje vazebná místa pro tuto kinázu (Ho, Ward et al. 2012). Aktivovaná c-AMP proteinkináza také fosforyluje CB1 receptory, čímž snižuje jejich aktivitu a brání tak inhibici výlevu neurotransmiterů ze zakončení (Huang, Chen et al. 2002).

Signální kaskáda CB1 receptoru vedoucí přes trimerní $G_{i/o}$ také negativně ovlivňuje Ca^{2+} napěťově závislé kanály typu N a P/Q (Pertwee 2006). Celkovou modulaci signálu CB1 receptorem, i vtok vápníku do buňky, může ovlivňovat CRIP1 – protein interagující s kanabinoidním receptorem 1 – navázaný na cytosolickém C-konci receptoru (Niehaus, Liu et al. 2007). Přestože úloha tohoto proteinu není zcela vysvětlena, díky své konformaci a funkčním doménám je možné, že přispívá k signalizaci CB1 receptoru i bez přítomnosti agonisty (Howlett, Blume et al. 2010). To by mohlo částečně vysvětlovat dříve pozorovanou konstitutivní aktivaci CB1 receptorů v nociceptivní signalizaci za fyziologických podmínek (Richardson, Aanonsen et al. 1998).

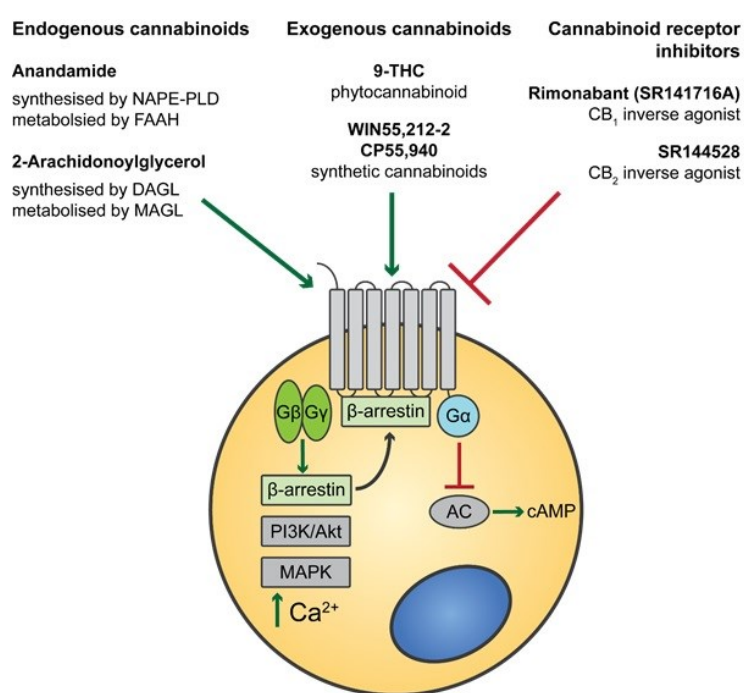
CB1 receptor po vazbě agonisty také, přes $\beta\gamma$ podjednotku G-proteinu, aktivuje p42/44 MAPK dráhu (Bouaboula, Poinot-Chazel et al. 1995) a p38 MAPK dráhu (Liu, Gao et al. 2000; Rueda, Galve-Roperh et al. 2000). Signální kaskáda vedoucí od p42/44 MAPK obecně působí v buňkách proliferačně, kdežto p38 MAPK je aktivována především v reakci na poškození či zánět (Malarkey, Belham et al. 1995; Robinson and Dickenson 2001). Obě MAPK dráhy ovlivňují přepis řady genů. Zejména p38 MAPK zasahuje také do aktivity a exprese TRPV1 receptoru (Ji, Samad et al. 2002; Kochukov, McNearney et al. 2009). Aktivace p38 MAPK dráhy má, jak již bylo naznačeno v kapitole o TRPV1 receptoru, pronociceptivní účinky a její blokování tlumí nociceptivní signalizaci zejména za patologických bolestivých stavů v DRG (Kim, Bae et al. 2002; Jin, Zhuang et al. 2003). Oproti tomu však v neuropatickém modelu CCI (chronic constriction injury) jiná MAPK dráha – ERK/MAPK – společně s PKC zvyšovala expresi CB1 receptorů ve spinálních neuronech zadních rohů míšních a zvyšovala atenuační působení CB1 agonistů, podaných intratekálně (Lim, Sung et al. 2003).

Vliv na nocicepci mají i kanabinoidní receptory exprimované gliemi v míše i thalamu, zejména za patologických bolestivých stavů (Toth, Jedrzejewski et al. 2010). Agonisté CB1 a CB2 receptorů potlačovali rozvoj neuropatické bolesti a nebyly pozorovány žádné pronociceptivní účinky. Agonista CB2 receptorů navíc snižoval akumulaci mikroglií blokováním p38 MAPK dráhy (Toth, Jedrzejewski et al. 2010). Dopady aktivace MAPK drah na nociceptivní signalizaci, zejména p38 dráhy, se tedy liší nejen v závislosti na buněčném typu (mikroglie, neurony), ale i lokalizaci buněk (neurony v DRG či spinální neurony).

Další drahou aktivovanou skrz CB1 receptory je ERK/MAPK a PI3K/proteinkináza B (PKB, někdy též Akt) signální kaskáda, přičemž aktivace ERK dráhy je závislá na přítomnosti fosfatidylinositol 3-kinázy (Galve-Roperh, Rueda et al. 2002). U nervových a gliových buněk bylo pozorováno, že krátkodobá aktivace ERK dráhy má antiapoptotické účinky a dlouhodobá naopak brání růstu a vede k buněčné smrti (Grewal, York et al. 1999; Galve-Roperh, Rueda et al. 2002). V souvislosti s nocicepcí je třeba připomenout, že ERK i PI3K mohou také fosforylovat a měnit expresi TRPV1 receptorů a přispívat tak k jejich senzitivizaci (Hensellek, Brell et al. 2007; Fernandez-Carvajal, Fernandez-Ballester et al. 2011). Zůstává však samozřejmě otázkou, zda právě stimulace CB1 receptorů v živém organismu aktivuje ERK a PI3K takovým způsobem (ať už kvůli kolokalizaci či souběhu podnětů/agonistů na dané buňce, kde by se takový mechanismus

mohl projevit), aby senzitivizovaly kapsaicinové receptory. Senzitizace i inhibice kapsaicinem otevřených TRPV1 receptorů přes CB1 receptory byla experimentálně prokázána na kultuře HEK buněk (Hermann, De Petrocellis et al. 2003). Senzitizace byla závislá na produkci c-AMP (a následné aktivaci c-AMP závislé PKA), pravděpodobně párováním kanabinoidního receptoru s $G_{\alpha s}$. Inhibice TRPV1 receptorů byla způsobena naopak snížením koncentrace c-AMP (přes $G_{\alpha i}$) s možným přispěním aktivace PI3K a PLC, které vedou k tvorbě PIP₂ (Ho, Uezono et al. 1999; Hermann, De Petrocellis et al. 2003). Tato diskutovaná možnost má však ambivalentní důsledky, neboť PI3K a PLC přispívají k senzitivizaci TRPV1 receptorů a PIP₂ naopak kompetuje o vazebné místo s další kinázou, PKC (Chuang, Prescott et al. 2001; Hermann, De Petrocellis et al. 2003; Ferreira, da Silva et al. 2004; Zhang, Huang et al. 2005). Proteinkináza C naopak negativně ovlivňuje aktivitu CB1 receptoru. Po fosforylaci CB1 receptoru dochází ke konformační změně, kdy tento receptor přestává blokovat napětově závislé Ca²⁺ kanály a neudrží se otevřené draselné Kv1.4 kanály (Garcia, Brown et al. 1998).

Stručný přehled signálních drah, endogenních a exogenních agonistů a antagonistů kanabinoidních receptorů ilustruje Obrázek 7.



Obrázek 7 Signální dráhy CB1 a CB2 receptorů. Aktivace kanabinoidních receptorů endogenními agonisty (anandamidem či 2-arachidonoylglycerolem: 2-AG) i exogenními agonisty (fytokanabinoidy jako THC či uměle syntetizovanými jako WIN55,212-2) vede k rozpadu trimerního G proteinu na G_{α} podjednotku a $G\beta\gamma$ dimer. Alfa podjednotka navázaná na CB receptor je nejčastěji inhibičního typu a blokuje adenylyl-cyklázu (AC), tedy sekundárního posla c-AMP. Dimer $\beta\gamma$ aktivuje PI3K a MAPK dráhy, které mají vliv na fosforylaci dalších receptorů, a také mění

transkripci genů v jádru. Beta-arrestin se pak podílí na desenzitizaci aktivovaného CB receptoru, ale také může sloužit jako „lešení“ pro další proteiny vázající se na receptor (Turu and Hunyady 2010). Zkratky: NAPE-PLD = N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipáza D; FAAH = Fatty acid amide hydroláza; DAGL = Diacylglycerol lipáza; MAGL = Monoacylglycerol lipáza (Brodermann 2016).

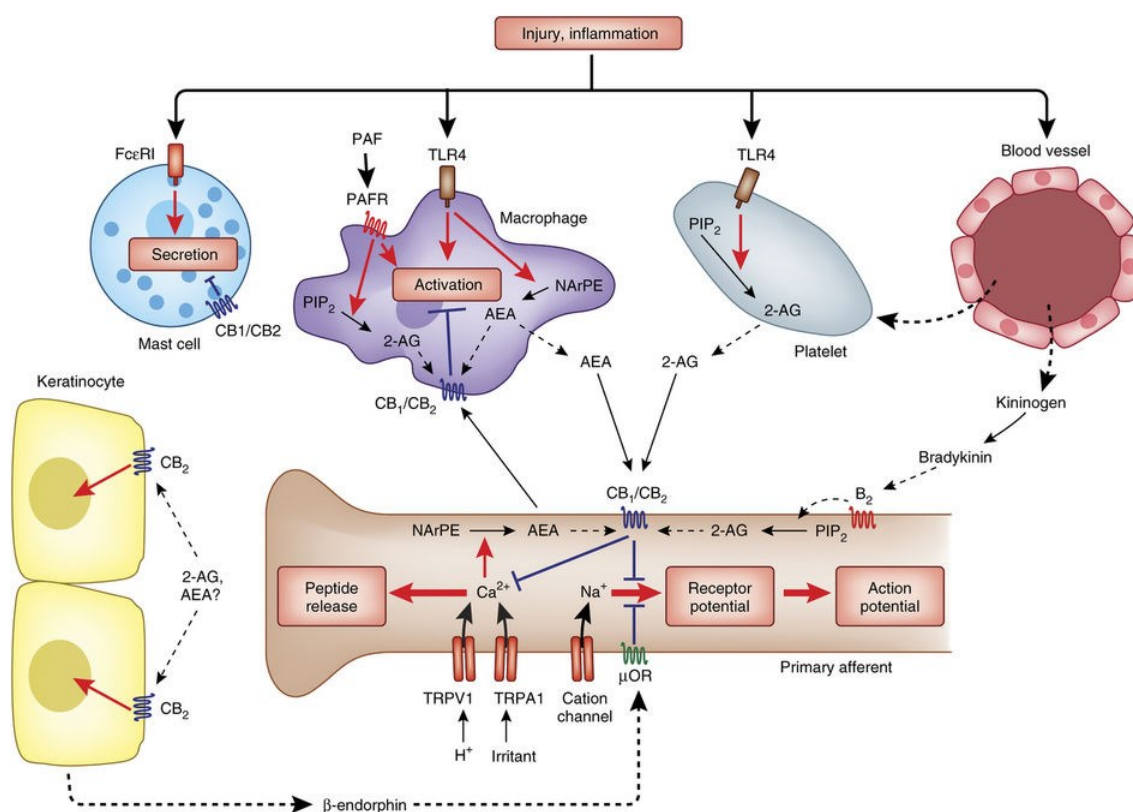
2.3.4.4 Desenzitizace CB1 receptoru

Podobně jako v případě TRPV1 receptoru i kanabinoidní receptor 1 může podléhat desenzitizaci. Mechanismus „znecitlivění“ je však odlišný, neboť CB1 receptor je typickým GPCR a nikoliv iontovým kanálem. Po vazbě ligandu na receptor dochází k fosforylaci receptoru pomocí GRK (GPCR kinázy), které zvýší afinitu β -arrestinu k receptoru (Jin, Brown et al. 1999; Kouznetsova, Kelley et al. 2002). Vazba β -arrestinu na fosforylované AA je závislá na rozpadu trimerního $G\alpha\beta\gamma$ na příslušné podjednotky, dochází k ní tedy až po spuštění signálních kaskád CB1 receptorem. Avšak poté β -arrestin brání další transdukcii signálu. Nezávisle na vazbě na fosforylované aminokyseliny CB1 receptoru, β -arrestin vazbou na klathrin přispívá k internalizaci tohoto receptoru (Hsieh, Brown et al. 1999; Jin, Brown et al. 1999). Arrestin se tímto způsobem váže na CB1 receptor i bez rozpadu trimerního G-proteinu na podjednotky. Internalizace receptoru může oproti desenzitizaci přispívat k rychlé regeneraci receptoru po krátkodobé vazbě agonisty, avšak je nutná defosforylace klatrinového obalu endocytického váčku a jeho acidifikace (Hsieh, Brown et al. 1999). Dlouhodobější vazba CB1 agonisty pak vede nejen k desenzitizaci, ale i ke snížení počtu CB1 receptorů vystavených na povrchu buňky (Jin, Brown et al. 1999). Na hipokampálních neuronech desenzitizace a internalizace presynaptických CB1 receptorů vedla k upregulaci glutamátergní signalizace (Kouznetsova, Kelley et al. 2002). Myši s knock-outem β -arrestinu 2 ($^{-/-}$) vykazovaly signifikantně vyšší antinociceptivní účinek THC v behaviorálních testech (Breivogel, Lambert et al. 2008). Syntetičtí plní agonisté CB1 receptoru (CP55940, methanandamide, JWH-073 a O-1812) se takto neprojevovali, přesto experimenty s knock-out β -arrestinem naznačují možný význam desenzitizace (a internalizace) i pro modulaci nocicepce pomocí CB1 receptoru.

2.3.4.5 Role periferních CB1 receptorů v nocicepci

Kanabinoidní receptory 1 exprimované na periferních zakončeních nociceptivních A δ a C vláken napomáhají atenuaci nociceptivního podnětu, vyvolaným například zraněním či zánětem. Na aktivaci těchto receptorů se podílejí buněčné elementy – makrofágy, mastocyty, krevní destičky či keratinocyty, které produkují endokanabinoidy AEA nebo také samy na svém povrchu vystavují kanabinoidní receptory 1 a 2 (Obrázek 8). V modelu periferního zánětu vyvolaného karagenanem vedlo lokální podání anandamidu k potlačení průvodních projevů zánětu – hyperalgesii, otoku i extravazaci plasmy z cév (Richardson, Kilo et al. 1998). Anandamid také inhiboval kapsaicinem, tedy

aktivovanými TRPV1 receptory, indukované uvolňování pronociceptivního CGRP (Richardson, Kilo et al. 1998). Kapsaicinem indukovanou hyperalgesii tlumil periferní a intratekálně podaný agonista WIN55,212-2, avšak pouze v případě, že byl podán před aplikací kapsaicinu (Johanek, Heitmiller et al. 2001). Použití tohoto agonisty také naznačilo roli periferních i centrálních CB1 receptorů v neuropatické bolesti (na modelu podvázání sedacího nervu), kdy intraplantární i intratekální podání vedlo k útlumu mechanické alldynie a bylo možné je zablokovat selektivním antagonistou CB1 receptorů (Fox, Kessingland et al. 2001).



Obrázek 8 Kanabinoidní signalizace v periferní nocicepci. Akutní poranění tkáně či zánět stimulují lokální výlev AEA či 2-AG z primárních sensorických vláken a okolních buněk, včetně makrofágů, mastocytů a krevních destiček. Syntéza AEA z jeho prekursoru N-arachidonoyl-fosfatidylethanolamin (NAPE) může být spouštěna vtokem Ca^{2+} do periferního nociceptoru. Makrofágy tvoří AEA po stimulaci Toll-like receptoru 4 (TLR4). Druhý endogenní agonista CB1 a CB2 receptorů, 2-AG, je uvolňován z nociceptorů po signalizaci bradykininu na příslušném receptoru (B_2), díky kterému je PIP_2 rozštěpen na 2-AG. Buňky, které nejsou neuronálního původu, mobilizují 2-AG analogickými signálními kaskádami po aktivaci PAF receptorů (platelet activating factor) – na makrofázích, popřípadě TLR4 receptory na krevních destičkách. Nově syntetizované endokanabinoidy aktivují CB1 a/nebo CB2 receptory, čímž modulují excitabilitu neuronu i signální kaskády závislé na Ca^{2+} , včetně TRPV1 receptoru. Na keratinocytech skrze CB2 receptory stimuluje uvolnění β endorfinu, který aktivuje μ -opioidní receptory na periferních nociceptorech a dále tak přispívá k atenuaci nocicepce. Aktivované CB1 a CB2 receptory tlumí aktivitu makrofágů a potlačují degranulaci mastocytů v oblasti poranění. $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ – vysokoafinní imuglobulin E. (Piomelli and Sasso 2014).

Experimenty s exogenními agonisty (WIN55,212-2 a arachidonyl-2-chloroethylamide - ACEA) ukázaly, že kanabinoidní receptory působí antinociceptivně na periférii i za fyziologického stavu či v řádu minut po navození lokálního stavu zvýšené citlivosti (Kelly and Chapman 2003; Yesilyurt, Dogrul et al. 2003; Johaneček and Simone 2004). Topicky podaný WIN55,212-2, především v kombinaci s morfinem, výrazně tlumil nociceptivní projevy v behaviorálních testech (Yesilyurt, Dogrul et al. 2003).

Endogenně se na společné modulaci nocicepce kanabinoidními a opioidními receptory podílí také CB2 receptory exprimované keratinocyty. Po jejich aktivaci keratinocyty uvolňují β endorfin, který váže μ opioidní receptor na periferním zakončení nociceptoru (Ibrahim, Porreca et al. 2005). Společná periferní aktivace CB1 a CB2 receptorů pomocí jejich endogenních ligandů synergisticky zesiluje jejich antinociceptivní působení při formalinem navozené hyperalgesii (Calignano, La Rana et al. 1998).

Injekčně aplikované ACEA na periférii tlumilo evokované proudy v *in vivo* elektrofyziologických snímáních aktivity spinálních neuronů, při testování mechanické citlivosti a to jak u zdravých zvířat, tak při navození periferního zánětu (Kelly and Chapman 2003). V souladu s těmito experimenty Amaya a kolegové (2006) ukázali, že intraplantárně aplikované ACEA tlumí termální hyperalgesii na modelu periferního zánětu vyvolaného kompletním Freundovým adjuvans (CFA). Stejná práce pak naznačuje zvýšenou expresi CB1 i TRPV1 receptorů v nociceptivních DRG neuronech, přičemž docházelo i k nárůstu kolokalizace těchto receptorů a anterográdnímu transportu CB1 receptorů do periferního zakončení.

Významnou úlohu periferních CB1 receptorů pak potvrdila jejich lokální delece z periferních nociceptorů, která vedla k výraznému snížení analgetického efektu lokálně a systémově podávaných kanabinoidů na modelech periferního zánětu a neuropatické bolesti (Agarwal, Pacher et al. 2007). Ve stejném roce pak byl syntetizován duální agonista CB1 a CB2 receptorů, označovaný jako CRA13 (cannabinoid receptor agonist 13) a někdy též CB13, který velmi omezeně prochází hematoencefalickou bariérou a zároveň působí antinociceptivně (Dziadulewicz, Bevan et al. 2007). První podání lidem ukázalo, že teprve vyšší dávky produkují nežádoucí účinky podobné THC a celkově je tato látka dobře tolerována (Gardin, Kucher et al. 2009). Dle nalezených zdrojů v současné době pokračuje vývoj vhodných excipientů (lipidických nanočástic), které by zvýšily terapeutickou účinnost a snížily množství nežádoucích účinků (Durán-Lobato, Martín-Banderas et al. 2016).

Role kanabinoidních receptorů 1 (a také 2) v modulaci nocicepce je na periferní úrovni poměrně detailně zmapována za fyziologických a patologických bolestivých stavů a již nyní jsou ve vývoji analgetika cílená pouze na tuto oblast. Avšak patologické bolestivé stavy mění nociceptivní signalizaci i za hematoencefalickou bariérou. Tato práce se v následující sekci zaměřuje, stejně jako v případě TRPV1 receptorů, především na roli CB1 receptorů na modulaci této signalizace v zadním rohu míšním.

2.3.4.6 Úloha CB1 receptoru v synaptickém přenosu v zadním rohu míšním

Podobně jako na periférii, působení kanabinoidních receptorů 1 na míšní úrovni má spíše antinociceptivní charakter, avšak některé práce poukazují také na možnost pronociceptivní signalizace (Sousa-Valente, Varga et al. 2014; Brodermann 2016).

Na míšních zakončeních primárních aferentů jsou CB1 receptory exprimovány v hojně míře, především v nociceptivních aferentech tvořících synapse v lamině I a II (Hohmann and Herkenham 1999; Nyilas, Gregg et al. 2009; Veress, Meszar et al. 2013). Další studie pak lokalizovaly tyto receptory postsynapticky na interneuronech v této oblasti klíčové pro nocicepci, a také v gliích (Farquhar-Smith, Egertova et al. 2000; Hegyi, Kis et al. 2009; Pernia-Andrade, Kato et al. 2009).

Presynaptické tlumení glutamátergní signalizace v *substantia gelatinosa* bylo pozorováno v elektrofyziologických experimentech po podání syntetického agonisty CB1 receptorů (Morisset and Urban 2001). Intrathekální podání CB1 agonisty, na modelu zánětlivé bolesti, tlumilo testovanou mechanickou allodynii a hyperalgesii, pravděpodobně výše popsaným ovlivněním výlevu glutamátu (Agarwal, Pacher et al. 2007). Při poškození periferních nervových vláken trvalou konstrikcí (CCI) dochází ke zvýšení exprese CB1 receptorů v lamině I a II, díky ERK-MAPK dráze, čímž je dále zesílena jejich antinociceptivní role (Lim, Sung et al. 2003). Stejný model neuropatické bolesti však nemění hladiny endogenních kanabinoidů, což by mohlo naznačovat, že právě změna exprese CB1 receptorů je klíčovým parametrem antinociceptivní modulační během patologických bolestivých stavů (Wilkerson, Niphakis et al. 2016). S ohledem na další studie CB1 receptorů (vizte níže) na inhibičních interneuronech je pravděpodobné, že nárůst exprese CB1 receptorů za těchto podmínek se týká spíše presynaptických receptorů na primárních aferentech.

Wilkerson a kolegové (2016) ve své práci také popisují synergistický účinek morfinu a 2-AG, agonistů μ -opioidních a CB1 receptorů, potlačujících CCI-indukovanou

mechanickou allodynii a tepelnou hyperalgesii. Agonista CB1 receptorů nebyl aplikován přímo, ale byl podáván MJN110, inhibitor enzymu degradujícího 2-AG (monoacylglycerol lipáza, MAGL), čímž docházelo k nárůstu hladiny 2-AG v míše. Díky možnosti podání nižších dávek morfinu a inhibitoru MAGL nedocházelo ke vzniku tolerance down-regulací a desenzitizací CB1 a μ -opioidních receptorů. Tento přístup také snižoval množství vedlejších účinků, obvykle provázející opioidní či kanabinoidní léčbu.

Nejen CB1, ale také CB2 receptory v míše přispívají k atenuaci bolesti. Model akutní pooperační bolesti ukázal zvýšenou expresi CB1 a zejména CB2 receptorů na astrocytech v zadním rohu míšním. Zde jejich aktivita blokovala prozánětlivou p38 MAPK dráhu a urychlovala odeznění pooperační bolesti (Alkaitis, Solorzano et al. 2010).

Některé další práce ukazují na pronociceptivní působení CB1 receptorů v míše způsobujících uvolnění substance P z primárních aferentů (Zhang, Chen et al. 2010). Navrženým mechanismem je snížení výlevu GABA a opioidů z inhibičních interneuronů, tedy tzv. disinhibice. Elektrofyziologická měření inhibičních postsynaptických proudů po aktivaci i zablokování CB1 receptorů v interneuronech tuto možnost podporují (Pernia-Andrade, Kato et al. 2009). Inhibiční neurotransmitery vazbou na presynaptické GABA_B a μ -opioidní receptory blokují napětově závislé Ca²⁺ kanály. Díky snížení intracelulární koncentrace vápníku nedochází k uvolňování substance P z primárních nociceptivních aferentů (Zhang, Chen et al. 2010). Kanabinoidní receptory 1 na inhibičních interneuronech se dle výsledků behaviorálních testů podílejí na rozvoji sekundární hyperalgesie a allodynie po lokálním podání kapsaicinu či elektrické stimulaci C vláken (Pernia-Andrade, Kato et al. 2009). Tyto experimenty naznačují možnou kooperaci v nociceptivní signalizaci mezi periferními TRPV1 a míšními CB1 receptory. K podobným závěrům dospěla i studie Fioravantiho a kolegů (2008). Myši s vypnutým genem pro CB1 (-/-) vykazovaly výrazně nižší behaviorální odpovědi po lokální aplikaci kapsaicinu. Na základě dosažených výsledků autoři navrhuje, že tonická aktivita CB1 receptorů přispívá k udržení senzitivace TRPV1 receptoru skrze PLC, aktivované skrze G_{αq} podjednotku trimerního G proteinu.

Modulační účinky presynaptických CB1 receptorů jsou také retrogradně ovlivněny produkcí endokanabinoidů, které budou podrobněji rozebrány v následující kapitole. Postsynapticky uložené mGluR 5 receptory aktivují syntézu 2-AG, který je retrogradně transportován k presynaptickým CB1 receptorům (Nyilas, Gregg et al. 2009). To přispívá k potlačení další nociceptivní signalizace.

Úloha CB1 receptorů v nociceptivní signalizaci se neomezuje jen na periferii a zadní roh míšní, ale významně zasahuje i do vyšších pater CNS. V zadním rohu míšním, oproti periferii, je méně jednoznačná role kanabinoidních receptorů, zejména v souvislosti s aktivitou TRPV1 kanálu. Jednu z pravděpodobných příčin představují společní endogenní agonisté obou receptorů, kterým je věnována následující kapitola.

2.3.5 Endovaniloidy/endokanabinoidy

Endovaniloidy a endokanabinoidy představují početnou skupinou lipidických molekul odvozených od kyseliny arachidonové. Tato skupina zahrnuje široce studované látky, jako je anandamid a 2-arachidonoylglycerol (2-AG), tak i další molekuly (oleoylethanolamid, N-oleoyldopamin, O-arachidonoylethanolamin, noladin ether, N-arachidonoyl dopamin), jejichž role v signalizaci není dosud zcela objasněna. Některé z těchto látek aktivují pouze kanabinoidní receptory (CB1 a CB2), jako například 2-AG a noladin ether (Di Marzo 2008). Oproti tomu některé vykazují výrazně vyšší afinitu k vaniloidnímu receptoru 1 (TRPV1) než k CB receptorům. Mezi takové molekuly patří N-oleoyldopamin a oleoylethanolamin (Jara-Oseguera, Simon et al. 2008). Několik endokanabinoidů/endovaniloidů, jako je AEA a N-arachidonoyl dopamin, v závislosti na své koncentraci aktivuje jak CB1, tak TRPV1 receptory (Pertwee 1999; Zygmunt, Petersson et al. 1999; Ross 2003). Preference vůči CB1 či TRPV1 receptorům je také zprostředkována jejich lokalizací a rozčleněním jejich aktivních míst (Millns, Chimenti et al. 2006). U CB1 receptorů se agonisté vážou z extracelulární strany, naproti tomu vazebné místo agonistů u TRPV1 receptorů je intracelulární (Shire, Calandra et al. 1996; Jung, Hwang et al. 1999). Díky tomuto překryvu mezi agonisty CB a TRPV1 receptory někteří autoři popisují TRPV1 receptory jako ionotropní kanabinoidní receptory (Akopian, Ruparel et al. 2009; Borroto-Escuela, Romero-Fernandez et al. 2013).

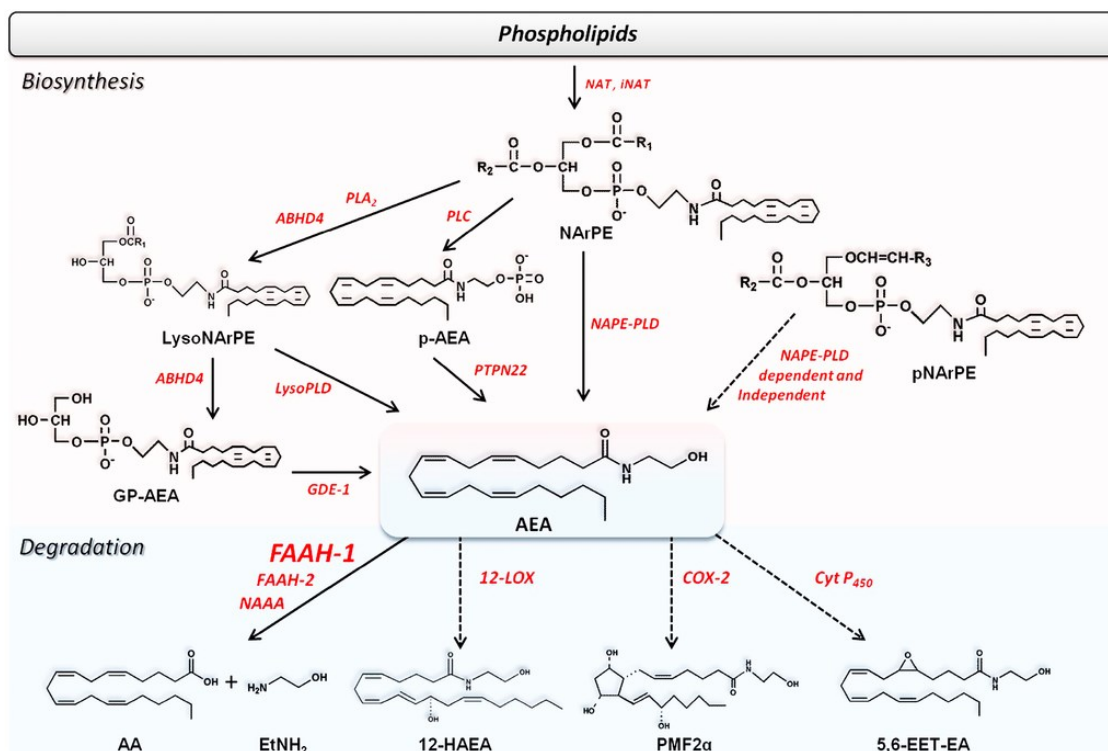
Endovaniloidy/endokanabinoidy hrají velmi důležitou roli v nocicepci a to jak v periferii, tak CNS. Největší pozornost v této práci bude věnována míšní úrovni, zejména zadnímu rohu míšnímu. Endovaniloidy/endokanabinoidy nejsou uskládány v buněčných kompartmentech, ale jsou syntetizovány pouze v případě potřeby několika metabolickými drahami (Ahluwalia, Yaqoob et al. 2003; van der Stelt, Trevisani et al. 2005; Vellani, Petrosino et al. 2008).

Různé endovaniloidy/endokanabinoidy spouštějí odlišné signální dráhy a, jak ukazují některé nedávné výzkumy, tyto dráhy se mohou vzájemně ovlivňovat. V některých

specifických oblastech mozku tak dochází k tzv. cross-talk mezi TRPV1 a CB1 receptory (Di Marzo and Cristino 2008). Například ve striatu myši dochází aktivací TRPV1 receptorů pomocí AEA ke snížení koncentrace a fyziologického účinku jiného endokanabinoidu 2-AG (Maccarrone, Rossi et al. 2008).

Hlavní endokanabinoid/endovaniloid AEA je syntetizován enzymy závislými na Ca^{2+} , jako je N-arachidonoylfosfatidylethanolamin fosfolipáza D – NAPE-PLD (Okamoto, Morishita et al. 2004), ale i enzymy na vápníku nezávislými – GDE1, ABHD4 (Fezza, Bari et al. 2014; Varga, Jenes et al. 2014). Podrobněji vše popisuje Obrázek 9.

Z hlediska nocicepce a zejména míšní transmise zprostředkované TRPV1 receptory se ukazuje jako významná na vápníku nezávislá syntéza anandamidu (Varga, Jenes et al. 2014), přestože NAPE-PLD je také exprimováno na nociceptivních primárních aferentech společně s TRPV1 receptory a také na míšních neuronech a gliích (Nagy, Fedonidis et al. 2009; Hegyi, Hollo et al. 2012; Moreno-Martet, Mestre et al. 2012). Která z těchto cest převažuje a zda vůbec, však zdaleka není uzavřenou otázkou a teprve následující studie ukáží, jak je nastavena rovnováha mezi těmito enzymy.



Obrázek 9 Syntéza a degradace anandamidu. Anandamid je syntetizován z prekursoru NA(r)PE buď přímo pomocí NAPE-PLD či nepřímo přes jiné fosfolipázy (PLC, PLA₂) a další enzymy (fosfodiesterázy GDE1 či α/β-hydroláza ABHD4 ad.). Degradace pak probíhá převážně přes FAAH, kdy vzniká kyselina arachidonová (zde AA). K tomu také částečně přispívají i další enzymy jako cyklooxygenáza 2 (COX-2), která produkuje prozánětlivé prostaglandiny. I další produkty degradace AEA, včetně AA, mohou ovlivňovat zánětlivé procesy. Zkratky: NAAA, N-acylethanolamine-hydrolyzující kyselá amidáza; NArPE, N-arachidonoyl-fosfatidylethanolamin; pNArPE, N-arachidonoyl-ethanolamin plasmalogen; ABHD4, α/β-hydroláza 4; NAPE-PLD, N-arachidonoylfosfatidylethanolamin fosfolipáza D; AA, arachidonová kyselina; COX-2, cyclooxygenáza 2; Cyt P₄₅₀, cytochrom P450; EET-EA, epoxyeicosatrienoyl ethanolamid; EtNH₂, ethanolamin; FAAH, hydroláza mastných kyselin; GP-AEA, glycerophospho-AEA; GDE1, glycerofosfodiester fosfodiesteráza 1; 12-HAEA, 12-hydroxyanandamid; lyso-NArPE, lyso-N-arachidonoylphosphatidylethanolamin; 12-LOX, 12-lipoxygenáza; pAEA, phospho-AEA; NAT, N-acyl-transferáza; iNAT, na vápníku nezávislá N-acyltransferáza; PMF2α, prostamid F2α; PLA₂, phospholipáza A2; PLC, phospholipáza C; lyso-PLD, lyso-phospholipáza D; PTPN22, protein tyrosin phosphatáza, nerekceptorový typ 22. (Fezza, Bari et al. 2014).

Endovaniloidy účinkují parakrinně či autokrinně, tedy na krátkou vzdálenost díky syntéze dle aktuálních požadavků organismu a jejich následné rychlé degradaci pomocí hydrolázy mastných kyselin (FAAH) a MAGL (Ahluwalia, Yaqoob et al. 2003; van der Stelt, Trevisani et al. 2005; Vellani, Petrosino et al. 2008). Avšak Richardson a kolegové (1998) ve své studii popisují tonickou aktivitu CB1 receptorů, což by mohlo ukazovat naopak na kontinuální syntézu endovaniloidních látek, jako je AEA. Některé novější publikace tuto hypotézu nepřímo podporují (Alkaitis, Solorzano et al. 2010; Okine, Norris et al. 2012; Guindon, Lai et al. 2013).

Kanabinoidní a vaniloidní systémy, přestože sdílí podobné agonisty, mají rozdílnou úlohu v nocicepci, podrobněji diskutované v předchozích kapitolách. Hlavní úloha kanabinoidního systému spočívá především v tlumení nociceptivní signalizace. Změny tohoto systému za patologických podmínek se na úrovni míchy podílejí na heterosynaptické centrální senzitivizaci (Starowicz and Przewlocka 2012). Nociceptivní signální kaskády zprostředkované aktivací TRPV1 receptorů mají naproti tomu spíše excitační charakter. Za fyziologického stavu je nutná také vyšší koncentrace endovaniloidů k aktivaci TRPV1 receptorů, ve srovnání s CB1 receptory (Zygmunt, Petersson et al. 1999; Spicarova and Palecek 2009). Avšak při některých patologických stavech se citlivost vůči těmto agonistům zvyšuje, jak ukázala řada studií v modelech neuropatické a zánětlivé bolesti (Singh Tahim, Santha et al. 2005; Spicarova and Palecek 2009; Starowicz, Makuch et al. 2012). Studie Guindona a kolegů (2013) popisuje další možnou funkci TRPV1 receptorů při neuropatické bolesti. Ta souvisí s upregulací FAAH v daném modelu neuropatické bolesti, což vede ke snížení hladiny AEA a k behaviorálním projevům – hyperalgesii a allodynii. Použitím antagonistů FAAH došlo k potlačení allodynii, ale tento anti-allodynický efekt byl zvrácen aplikací antagonistů TRPV1 a CB1 receptorů. Tyto výsledky naznačují možnou antinociceptivní roli TRPV1 receptorů zprostředkovanou aktivací endokanabinoidního systému za patologických podmínek. Zvýšená hladina anandamidu, dosažená aktivací endokanabinoidního systému, může mít řadu fyziologických dopadů: Aktivaci kanabinoidních receptorů (CB1, částečně CB2), desenzitivizaci TRPV1 receptorů či alosterickou modulaci nekanabinoidních receptorů (5-HT₂, 5-HT₃ serotoninových receptorů, nikotinových acetylcholinových receptorů ad.) (Starowicz and Przewlocka 2012). Přesné mechanismy, které stojí v pozadí možné antinociceptivní role TRPV1, však ještě čekají na svůj objev.

Zejména práce Guindona a kolegů (2013) a Di Marza s Cristinem (2008) naznačují některé možné interakce mezi endovaniloidním a endokanabinoidním systémem. Dohromady tak tvoří skrze společné agonisty a další prvky komplexní soustavu, která může hrát významnou úlohu v modulaci nocicepce a je slibným cílem pro možný vývoj analgetické léčby nejen na míšní úrovni.

2.3.6 Nociceptivní úloha prozánětlivého cytokinu TNF α a napětově závislých Na⁺ 1.3 a 1.8 kanálů v neuropatické bolesti

Dojde-li k neurogennímu zánětu, vzrůstá hladina cytokinů a aktivují se tak gliové a imunitní buňky (Marchand, Perretti et al. 2005; McMahon, Cafferty et al. 2005). Významnou roli v tomto směru hraje cytokin tumor nekrotizující faktor alfa (TNF α), který moduluje periferní i centrální nociceptivní signalizaci po poškození periferních nervů (Leung and Cahill 2010) a přispívá k rozvoji tepelné hyperalgesie a mechanické allodynie (Kawasaki, Zhang et al. 2008; Gao, Zhang et al. 2009; Zhang, Berta et al. 2011). Hladina TNF α při rozvoji neuropatické bolesti vzrůstá v neuronech dorzálních ganglií (Schafers, Geis et al. 2002; Schafers, Geis et al. 2003; Jancalék, Dubový et al. 2010) i v míše (DeLeo, Colburn et al. 1997; Winkelstein, Rutkowski et al. 2001; Ohtori, Takahashi et al. 2004), přičemž hlavní zdroj tohoto cytokinu představují gliové buňky (McMahon, Cafferty et al. 2005).

Nervové buňky reagují na poškození periferních vláken také zvýšenou expresí receptorů pro TNF α – TNFR1 a TNFR2 (Randic, Jiang et al. 1993; Liu, Zhou et al. 2007). Upregulace obou receptorů byla prokázána na rozličných modelech neuropatické bolesti v DRG neuronech (Shubayev and Myers 2001; Schafers, Sorkin et al. 2003; Dubový, Jancalék et al. 2006) i v míše (Ohtori, Takahashi et al. 2004; Xu, Xin et al. 2006). Každý z těchto receptorů ovlivňuje nociceptivní signalizaci jiným způsobem. Periferní TNFR1 receptory se zásadním způsobem podílejí na rozvoji hypersenzitivity související s neuropatií, jak prokázala studie na modelu CCI - chronic constriction injury, trvalé podvázání nervu (Sommer, Schmidt et al. 1998). Pozdější studie na knock-out myších ve stejném neuropatickém modelu (CCI) prokázala, že TNFR1 hraje roli v tepelné hyperalgesii, zatímco mechanická allodynie byla zachována (Vogel, Stallforth et al. 2006). Naproti tomu TNFR2 receptor zvyšuje excitaci primárních senzoričkových neuronů po podvázání míšních nervů (SNL) a zároveň po intrathekálním podáním agonistů TNFR1 i TNFR2 receptoru došlo k masivnímu nárůstu hypersenzitivity vůči bolestivým podnětům (Schafers, Sommer et al. 2008). Míšní TNFR1 i TNFR2 receptory zprostředkovávají tepelnou hyperalgesii vyvolanou intrathekálním podáním TNF α . Při knock-out genů pro oba receptory tento účinek TNF α kompletně vymizel (Zhang, Berta et al. 2011). V této sérii experimentů navíc podání TNF α zvýšilo frekvenci spontánních EPSC (excitačních postsynaptických proudů), ale tento jev zmizel v TNFR1^{-/-} myších a zmenšil se u TNFR2^{-/-} myší (Zhang, Berta et al. 2011).

Na subpopulaci DRG neuronů byla pozorována koexprese mRNA TNFR1 a TRPV1 receptorů i společná imunoreaktivita jejich proteinů (Li, Ji et al. 2004; Hensellek, Brell et al. 2007). Cytokin TNF α zvyšuje citlivost kultivovaných DRG neuronů vůči kapsaicinu a zároveň posiluje expresi TRPV1 receptorů v těchto neuronech (Nicol, Lopshire et al. 1997; Khan, Diogenes et al. 2008). Pozorované posílení exprese TRPV1 receptorů bylo závislé na přítomnosti TNFR2 (Constantin, Mair et al. 2008). Předchozí experimenty naší laboratoře ukázaly zvýšenou citlivost TRPV1 receptorů vůči endogennímu agonistovi N-oleoyldopaminu (OLDA) po inkubaci kontrolních míšních řezů v roztoku TNF α (Spicarova and Palecek 2010). V těchto experimentech nebyly přítomny DRG neurony, což by naznačovalo, že zmíněný účinek TNF α byl zprostředkován fosforylací TRPV1 receptorů a nikoliv nárůstem jejich exprese zmíněným výše (Huang, Zhang et al. 2006). Kapsaicinem evokované proudy jsou výrazně zesilovány aktivací PKC či p38 MAPK dráhy po aplikaci TNF α v kultuře DRG neuronů (Constantin, Mair et al. 2008). Dále vyšší hladina TNF α a nárůst počtu příslušných receptorů (TNFR1 a TNFR2) na neuronech po neuronálním poranění přispívá k LTP potenciaci, jednomu z mechanismů provázejících rozvoj neuropatické bolesti, skrze aktivaci signálních kaskád NF- κ B, JNK a p38 MAPK (Liu, Zhou et al. 2007).

TNF α může také ovlivňovat napětově závislé sodíkové kanály Na_v, zvláště tetrodoxin senzitivní (TTX-S) Na_v 1.3 a tetrodoxin rezistentní (TTX-R) Na_v 1.8, které se podílejí na rozvoji neuropatické bolesti (Cummins, Sheets et al. 2007). Na modelu axotomie (kompletní přetěti sedacího nervu) se ukázalo, že v malých DRG neuronech dochází k upregulaci mRNA Na_v 1.3 kanálu a zároveň downregulaci Na_v 1.8 (Waxman, Kocsis et al. 1994; Dib-Hajj, Black et al. 1996). V souladu s těmito výsledky bylo pozorováno, že na neuronech po axotomii dochází ke čtyřnásobnému zrychlení přechodu z inaktivního do aktivního stavu u TTX-S sodných kanálů ve srovnání s kontrolními DRG neurony. Zároveň na neuronech po axotomii se výrazně snížilo množství TTX-R proudů (Cummins and Waxman 1997). Napětově aktivované sodné kanály, zejména Na_v 1.3 se vyskytují za normálních podmínek pouze v embryích, ne však u dospělých v DRG neuronech. K obnovení exprese dochází až při patologických změnách (Waxman, Kocsis et al. 1994). Naproti tomu potlačení TTX rezistentních proudů (pomocí antisense oligonukleotidové sekvence a následného knockdownu Na_v 1.8 kanálů) v DRG neuronech na neuropatickém modelu SNL vedlo k útlumu mechanické allodynie i tepelné hyperalgesie (Lai, Gold et al. 2002). Podobně antisense oligonukleotid cílený na Na_v 1.8 tlumil hypersenzitivitu na modelu CCI (Joshi, Mikusa et al. 2006). Poraněné DRG neurony projevují sníženou

expresi TTX rezistentních Na_v 1.8 kanálů, na druhou stranu při navození neuropatie pomocí SNL byla zvýšena imunoreaktivita na Na_v 1.8 podél sedacího nervu (Decosterd, Ji et al. 2002; Gold, Weinreich et al. 2003). Právě nárůst Na_v 1.8 kanálů na nezraněných DRG neuronech může přispívat k hyperexcitabilitě těchto buněk a být jedním z klíčových kroků pro rozvoj neuropatické bolesti (Gold, Weinreich et al. 2003). Nově vyvinutý blokátor těchto kanálů PF-01247324 úspěšně tlumil nociceptivní signalizaci v modelech neuropatické i zánětlivé bolesti (Payne, Brown et al. 2015). Výše popsané studie naznačují, že v rozvoji neuropatické bolesti je upregulace TTX-S Na_v 1.3 kanálů zásadní pro poškozené primární aferenty, zatímco nárůst TTX-R Na_v 1.8 kanálů je důležitý nepoškozených DRG neuronech. K tomu přispívá i $\text{TNF}\alpha$, jehož aplikace podél sedacího nervu vedla ke zvýšení exprese Na_v 1.3 i Na_v 1.8 kanálů a na behaviorální úrovni k mechanické allodynii (He, Zang et al. 2010).

Ovlivnění účinku $\text{TNF}\alpha$ a jeho receptorů tak může být jednou z cest k útlumu patologických bolestivých stavů, zvláště pak neuropatické bolesti.

3 CÍLE PRÁCE

Tato práce se zaměřuje na studium mechanismů nociceptivní signalizace na míšní úrovni s důrazem na změny probíhající při periferním zánětu a také při poškození periferních nervů. Zkoumána byla především modulace synaptického přenosu v zadním rohu míšním, kde se nacházejí první synapse aferentních nociceptivních drah, a představuje tak jednu z klíčových oblastí pro regulaci nocicepce.

Hlavním tématem práce bylo sledování možné interakce mezi TRPV1 a CB1 receptory skrze působení endokanabinoidů. Druhé téma představuje vliv cytokinu TNF α na nociceptivní signalizaci na míšní úrovni a především interakci s TRPV1 receptory.

- Produkce anandamidu po aplikaci 20:4-NAPE (N-arachidonoylfosfatidylethanolamin) na míšní řezy.
- Modulace miniaturních postsynaptických proudů (mEPSC) v neuronech zadního rohu míšního pomocí aplikace 20:4-NAPE za fyziologických podmínek a na modelu periferního zánětu.
- Modulace spontánních postsynaptických proudů (sEPSC) v neuronech zadního rohu míšního pomocí aplikace 20:4-NAPE za fyziologických podmínek a na modelu periferního zánětu.
- Modulace spontánních miniaturních postsynaptických proudů (sEPSC a mEPSC) v neuronech zadního rohu míšního pomocí cytokinu TNF α za fyziologických podmínek a na modelu periferní neuropatie.

4 Metody

Použité postupy a procedury ve všech studiích byly schváleny komisí pro práci se zvířaty Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání 246/1992 Sb., ve znění pozdějších předpisů, v souladu s pravidly IASP (International Association for the Study of Pain) pro práci s laboratorními zvířaty a Evropskou direktivou 86/609/EEC.

V popisovaných experimentech byly využívány zejména elektrofyziologické metody *in vitro* na akutních řezech z lumbální míchy. Byly snímány miniaturní a spontánní postsynaptické excitační proudy na opticky identifikovaných neuronech superficiální oblasti zadního rohu míšního pomocí metody terčíkového zámku v uspořádání snímání z celé buňky.

4.1 Použité chemikálie

V našich pokusech byly použity následující chemikálie:

- Agarosa (b. t. 80 – 85°C) - pro agarový blok fixující míchu při krájení
- Bikukulin methiodid
- D-glukosa
- Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4)
- EGTA ($\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$)
- HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$)
- Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)
- Hydroxid cesný (CsOH)
- Chlorid cesný (CsCl)
- Chlorid draselný (KCl)
- Chlorid hořečnatý (MgCl_2)
- Chlorid sodný (NaCl)
- Chlorid vápenatý (CaCl_2)
- Glukuronát delta lakton ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$)
- Strychnin
- TTX
- Capsaicin

- SB366791
- PF514273
- TNF α
- Anandamid
- 20:4-NAPE
- BSA
- DMSO

Veškeré látky byly dodány společnostmi Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika), Tocris Bioscience (Bristol, Velká Británie), AvantiLipids (Alabaster, USA) či AnalaR (Londýn, Velká Británie).

4.2 Použité roztoky

Na přípravu akutních míšních řezů jsme používali disekční extracelulární roztok (ESC) se sníženou koncentrací vápenatých iontů. Pro jejich následnou inkubaci byl aplikován snímací ECS s normální koncentrací vápníku. Oba roztoky byly po celou dobu experimentu syceny karbogenem (Linde Technoplyn, a. s., Praha, Česká Republika), 95 % O₂ a 5 % CO₂, za účelem dostatečného okysličení a udržení stabilního pH.

Pro krájení řezů bylo nutné míchu fixovat, proto byla vložena mezi dva agarové bločky.

Roztok na přípravu agaru měl následující složení (v mM): 160 NaCl, 2,5 KCl, 5 MgCl₂, 0,5 CaCl₂, 10 D-glukosa, 10 HEPES.

Disekční ECS obsahoval (v mM): 95 NaCl; 1,8 KCl; 7 MgCl₂; 0,5 CaCl₂; 26 NaHCO₃; 1,25KH₂PO₄; 25 D-glukosa; 50 sacharosa.

Snímací ECS obsahoval (v mM): 127 NaCl; 1,8 KCl; 1,3 MgSO₄; 2,4 CaCl₂; 26 NaHCO₃; 1,2 NaH₂PO₄; 25 D-glukosa.

Intracelulární roztok, kterým byly plněny elektrody, se skládal (v mM): 125 glukono-delta-lakton; 15 CsCl; 10 EGTA; 10 HEPES; 1 CaCl₂; 2 Na₂ATP; 0,5 NaGTP; pH roztoku bylo vyrovnáno pomocí CsOH na hodnotu 7,2.

K přípravě všech roztoků byla použita redestilovaná voda.

4.3 Příprava míšních řezů

Míšní řezy z lumbální oblasti byly připraveny dle metody dříve popsané (Palecek, Abdrachmanova et al. 1999; Spicarova and Palecek 2009). Experimentálními zvířaty byli samci laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) z kmene Wistar v postnatálním stáří 19 – 27 dnů (P19 – P27). Laboratorní potkan byl přiveden do celkové anestésie ketaminem (100 mg/kg, i. p., Narkamon, Zentiva) a xylazinem (10 mg/kg, i. p., Rometar, Zentiva), popřípadě isofuranem (3%). Následně byla provedena dorzální laminektomie, mícha vyjmuta a ihned přesunuta do disekčního ECS, jehož teplota byla maximálně 4°C pro zpomalení ischemických procesů. Zde byly z míchy odstraněny obaly *dura* a *pia mater* a odděleny zadní kořeny, bez poškození neuronů v zadním rohu v míšním. Očištěná mícha byla upevněna do žlábků mezi dvěma pevnými agarovými bločky připevněnými k podložce kráječe vteřinovým lepidlem. Pomocí kráječe (Leica, VT 1000 S, Nussloch, Německo) se žiletkou či safírovým nožem byly připraveny transversální míšní řezy o tloušťce 300 μ m. Po celou dobu krájení byla mícha ponořena v disekčním roztoku o teplotě 4°C a nižší. Krájení probíhalo za vysokých vibrací a nízké posuvné rychlosti, aby se co nejvíce zmenšilo mechanické poškození neuronů. Anestésie, disekce míchy, očištění míchy a její řezání byly nejkritičtějšími fázemi celého experimentu z hlediska jeho úspěšnosti. Rychlost a preciznost provedení těchto částí největším dílem ovlivnila vitalitu neuronů v akutních řezech.

Řezy byly následně inkubovány po dobu 30 minut v disekčním roztoku o teplotě ~33°C v komůrce ponořené v inkubační komoře (Memmert, Schwabach, Německo). Po této půlhodině byly řezy přeneseny do komůrky se snímacím ECS o laboratorní teplotě 21 – 24°C, kde byly uchovány až do zahájení snímání. První elektrofyziologické měření probíhalo nejdříve 1 hodinu po disekci míchy. Neurony v řezech připravených tímto způsobem byly vitální po dobu pěti až sedmi hodin.

Při přípravě TNF α inkubovaných řezů byly přeneseny do snímacího extracelulárního roztoku s 60 nM TNF α , kde byly ponechány minimálně po dobu dvou hodin před vlastním snímáním. Cytokin TNF α byl rozpuštěn v 0,1% BSA. Elektrofyziologické snímání v tomto případě začínalo nejdříve 3 hodiny po disekci.

Přibližný časový rozvrh experimentu:

1. Příprava akutních míšních řezů 25 min:
 - a. Celková anestésie 0 min.

- b. Dorzální laminektomie a vyjmutí míchy 0 – 3 min.
 - c. Odstranění míšních obalů 3 – 8 min.
 - d. Vložení do agarového bločku 8 – 10 min.
 - e. Míšní řezy – 300 μm 10 – 25 min.
2. Inkubace řezů v disekčním roztoku (33°C) 30 min.
 3. Přenos do pokojové teploty snímacího roztoku 30 – 32 min.
 4. Uchování řezů a vlastní elektrofyzilogie 1 – 7 hod.

4.4 Elektrofyzilogická měření

4.4.1 Aparatura a příslušenství

Jednotlivé míšní řezy byly umístěny do snímací komůrky o objemu zhruba 2 ml, kudy neustále protékal snímací roztok z aplikačního systému rychlostí ~2 ml za minutu. Řez byl fixován pomocí platinové podkovičky s napnutými nylonovými vlákny. Vizualizace buněk probíhala pod mikroskopem s diferenciálním interferenčním kontrastem, DIC (Leica, DM LFSA, Německo) za pomoci kamery (IR kamera Hitachi KP-200P, Japonsko) v infračervené oblasti spektra. Obraz byl pozorován na standardním TV/video monitoru (Hitachi VM-172, Japan). Pohyb snímací elektrody byl řízen mikromanipulátorem.

Snímané proudy byly zaznamenávány pomocí Axopatch-1D zesilovače a analogově-digitálního převodníku (Axon Instruments, Inc., CA, USA), propojenými s počítačem. Zde byla data analyzována softwarem pClamp 9.0 a 10.0 (Axon Instruments, Inc., CA, USA). Tento software byl využit i při pozdější off-line analýze. Registrované proudy byly filtrovány při 2 kHz a digitálně vzorkovány na 10 kHz.

Snímací aparatura pro elektrofyzilogické měření byla umístěna ve Faradayově kleci, ostatní elektronické přístroje mimo ni.

4.4.2 Skleněné mikroelektrody

Na snímání dat byly použity terčíkové skleněné mikroelektrody vytažené z borosilikátových trubiček (Rüchl Glass, Otovice, Česká Republika) o vnějším průměru 1,6 mm a vnitřním 0,97 mm. Přípravovány byly na tahači kapilár modelu P-97 (Sutter Instrument Co., USA). Po vytažení byly plněny snímacím intracelulárním roztokem pomocí stříkačky zakončené tenkou PVC trubičkou. Výsledný sériový odpor byl v extracelulárním roztoku 3,5 – 7,0 M Ω .

4.4.3 Metoda terčíkového zámku (patch clamp)

Postsynaptické miniaturní EPSC zprostředkované AMPA receptory v neuronech v superficiální oblasti zadního rohu míšního byly snímány metodou terčíkového zámku v konfiguraci snímání z celé buňky při stálém napětí, tedy napětového zámku (Hamill, Marty et al. 1981). Neurony, ze kterých jsme snímali, měly zřetelný tvar a některé i viditelné dendrity. Nacházely se většinou 5 – 20 μm pod povrchem řezu.

Snímání bylo prováděno pomocí mikroelektrody (vizte 4.4.2), v jejíž špičce byl vytvořen přetlak na odstranění zbytků membrán poškozených buněk, erytrocytů a extracelulární hmoty. Mikromanipulátory jsme elektrodu velmi pomalu přiblížili k neuronu, následně jsme se dotkli hrotem plazmatické membrány s viditelnou lehkou deformací této membrány. Vzápětí jsme sáním vytvořili podtlak v kapiláře, čímž došlo ke vzniku těsného kontaktu špičky kapiláry a membrány neuronu. Tento podtlak jsme udržovali až do vytvoření řádově 1 G Ω odporu na rozhraní mikroelektrody a buňky. S tím jsme nastavili hodnotu potenciálu na -70 mV. Následoval krátký prudší podtlak v kapiláře k protržení membrány buňky přisáté ke špičce. Tím vzniklo vodivé spojení mezi cytoplazmou neuronu a mikroelektrodou. Díky tomu bylo možné sledovat a zaznamenávat spontánní postsynaptické proudy. Sériový odpor neuronů byl kompenzován na 80 % a sledován po celou dobu snímacího protokolu.

4.4.4 Aplikace látek

Díky aplikačnímu systému je možná rychlá výměna extracelulárního roztoku a látek. Pro izolaci AMPA-EPSC byly do snímacího roztoku přidány následující látky:

1. Strychnin (5 μM) – kompetitivní antagonist glycinových receptorů
2. Bikukulin (10 μM) – reverzibilní antagonist GABA_A receptorů
3. Pro snímání miniaturních AMPA-EPSC bylo navíc dodáno TTX (0,5 μM) – reverzibilní antagonist Na⁺ kanálů – zábrana vzniku akčního potenciálu

V průběhu experimentu byly, dle daného protokolu, aplikovány antagonist TRPV1 receptorů (SB366791, 10 μM), antagonist CB1 receptorů (PF514273, 0,2 μM), či 20:4-NAPE (20 a 200 μM) po 6 a 4 minut. V některých experimentech byly tyto látky ko-aplikovány (4 minuty).

Ve studii vlivu cytokinu TNF α byl aplikován agonista TRPV1 receptorů (OLDA, 0.2 μM) po dobu 4 minut.

Na konci experimentálního protokolu byl aplikován kapsaicin (0,2 μM) pro zjištění, zda míšní neuron má vstupy z TRPV1 pozitivních primárních aferentních vláken.

Kapsaicin, SB366791 a PF514273 byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu, DMSO, jehož koncentrace nepřesáhla 0,1 % v konečném roztoku. 20:4-NAPE bylo rozpuštěno v chloroformu, jehož koncentrace byla $<0,1$ % v konečném roztoku. Koncentrace selektivního antagonisty TRPV1 receptorů SB366791 (10 μM) byla stanovena na základě selektivity $pA_2 = 7,71$ (Gunthorpe, Rami et al. 2004) a předchozích studií (Spicarova and Palecek 2009; Spicarova, Adamek et al. 2014). Koncentrace vysoce selektivního antagonisty CB1 receptorů PF514273 (0,2 μM) byla určena na základě $K_i = 1$ nM (Dow, Carpino et al. 2009) a potřebné difuze skrz míšní řez. Koncentrace zvolené pro 20:4-NAPE (20 a 200 μM) byly stanoveny na základě předběžných výsledků a experimentů provedených na buněčných kulturách z DRG neuronů (Varga, Jenes et al. 2014).

4.5 Analýza dat

V této práci byly vyhodnoceny frekvence a velikosti amplitud mEPSC a sEPSC v úseku dlouhém 2 minuty v kontrolních a experimentálních částech záznamu podobně, jak již bylo popsáno (Spicarova and Palecek 2009). Pro analýzu frekvence a amplitudy byla použita shodná kritéria hodnocení a stejné úseky záznamu. Nejmenší započítané mEPSC a sEPSC měly velikost ≥ 5 pA, tedy zhruba dvojnásobku velikosti šumu.

Frekvence a velikosti mEPSC a sEPSC jsou vyjádřeny v průměrech se střední chybou průměru (SEM). Část dat byla vztahována vůči kontrolním hodnotám bez aplikací jakýchkoliv látek (vyjma výše uvedených antagonistů) – tyto kontroly odpovídaly tedy 100 %. Druhou variantou, je porovnání absolutní frekvence a amplitudy mEPSC a sEPSC (Hz, resp. pA).

Statisticky významný rozdíl mezi skupinami byl vypočítán metodou jednocestné analýzy rozptylu ANOVA, popřípadě ANOVA pro opakovaná měření aplikovaná na pořadí, či párovým t-testem při porovnání dvou skupin, s následným post-hoc testem (Student-Newman-Keulsův či Bonferroniho test). Kolgorov-Smirnovův test byl použit pro hodnocení statistické významnosti u kumulativních dat. Za signifikantní byla určena hladina významnosti $p < 0,05$. Ke statistickému hodnocení a grafickému zobrazení byly použity programy SigmaStat 3.5 a SigmaPlot 9.0 (Systat Software, CA, USA).

4.6 Periferní neurogenní zánět jako model zánětlivé bolesti

Periferní zánět byl vyvolán u samců laboratorních potkanů kmene Wistar (P18 – P22) v etherové anestezii 24 hodin před přípravou míšních řezů. Obě zadní končetiny byly subkutánně injikovány 3% směsí karageenanu a kaolinu ve fyziologickém roztoku. Zvířata poté byla navracena do jejich domovských chovných klecí. Tento model zánětlivé bolesti byl zevrubně popsán a stanoven Renem a Dubnerem (Ren and Dubner 1999).

4.7 Přetětí sedacího nervu jako model neuropatické bolesti

Axotomie sedacího nervu byla prováděna na samcích potkana kmene Wistar (P18 – 22) pět dní před přípravou akutních míšních řezů. Zvířatům byl v celkové éterové anestezii přetát sedací nerv na obou zadních končetinách nad jeho roztrojením, kvůli jistotě přerušení všech vláken tohoto nervu. Poté byla rána stažena a zalepena. Zvířata poté byla navracena do jejich domovských chovných klecí.

4.8 Behaviorální metody – testování citlivosti zvířat k tepelným podnětům

U laboratorních potkanů byla testována citlivost v oblasti *planta pedis* zadní končetiny k tepelným podnětům pomocí tepelného stimulatoru. Od počátku působení tepelného podnětu byl měřen čas až do reflexního odtažení zadní končetiny. Tepelný podnět byl aplikován na danou končetinu pětkrát v pětiminutových intervalech a hodnoty byly u jednotlivých zvířat zprůměrovány. Ke statistickému hodnocení byl použit párový t-test vzhledem ke kontrolním hodnotám před subkutánní injekcí směsi karageenanu a kaolinu.

4.9 Hmotnostní spektrometrie AEA

Příprava akutních míšních řezů probíhala způsobem popsáným v sekci „Příprava míšních řezů“. V každém z pěti experimentů bylo použito 12 až 15 akutních míšních řezů. Po 30 minutách inkubace v disekčním roztoku při 33°C byly řezy přeneseny do uzavíratelné plastové zkumavky se snímacím roztokem, syceným karbogenem (95% O₂ – 5% CO₂) po celou dobu experimentu. Po 10 minutách inkubace byl celý objem roztoku odebrán (jako vzorek) a ihned hluboce zamražen pro následnou hmotnostní spektrometrii. V každém experimentu bylo odebráno 6 vzorků. Vzorky 1 – 3 byly vždy kontrolní, obsahovaly pouze kontrolní roztok, který běžně používáme pro elektrofyziologická měření. Výsledky z těchto kontrolních vzorků byly zprůměrovány a pro následné statistické hodnocení počítány jako jeden. Vzorek 4 obsahoval 200 μM NAPE ve snímacím roztoku. Vzorky 5 a 6 byly opět pouze snímací roztoky (tzv. vymývání).

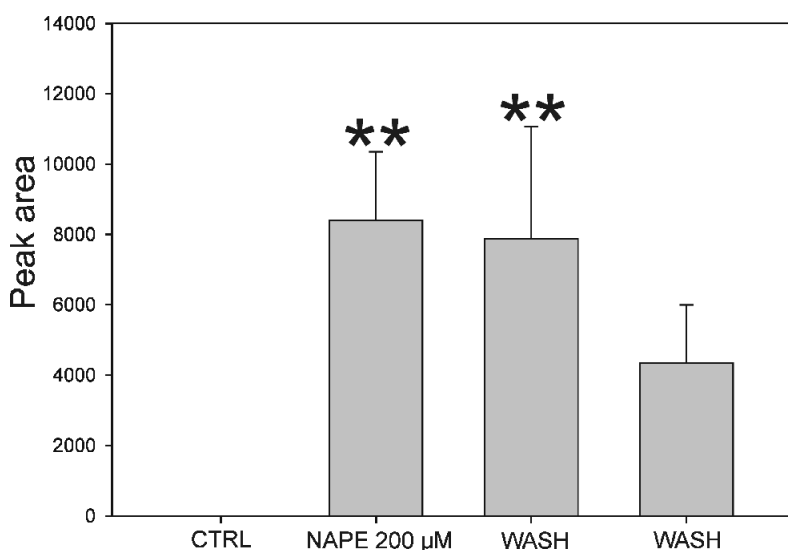
Během následné hmotnostní spektrometrie byly všechny vzorky analyzovány na přítomnost AEA. Na kalibraci spektrometrie byly použity roztoky AEA a NAPE z chemikálií z firem Avanti Polar Lipids (NAPE) a Tocris Cookson (AEA). Anandamid byl kvantifikován pomocí RP-HPC (vysokoúčinná chromatografie na nepolárních adsorbentech) systému Agilent 1100 LC (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Systém se skládá z dvoupístové pumpy, autosampleru, odvodušňovače mobilní fáze a termostat kolonu. Chromatografická separace proběhla v Kinetexu 2.6u PFP, sloupci 100A (100 x 2.1 mm I.D., Phenomenex, Torrance, CA, USA). Vzorek o objemu 10 µl byl injikován do sloupce a eluován gradientem (A) voda-kyselina mravenčí 100:0.1 v/v a (B) acetonitril-kyselina mravenčí 100:0.085 v/v, při průtoku 0.35 ml/min a teplotě 40°C. Gradient začínal v 80:20 (A/B) po dobu 5 minut, přičemž během 10 minut dosáhl 100 % koncentrace B v gradientu. Následujících 5 minut probíhala izokratická eluce při 100 % přítomnosti B. Eluce byla monitorována hmotnostním spektrometrem na iontové pasti (Agilent LC-MSD Trap XCT-Ultra; Agilent, Palo Alto, CA, USA). Byla použita pozitivní ionizace elektrosprejem za atmosférického tlaku (API-ESI) pro monitoring mnohočetných reakcí (MRM) pro poměr hmotnosti a náboje m/z u anandamidu 348.1>287.1 (retenční čas 11.2 min). Rozsah tohoto poměru byl 100 – 400 m/z za těchto podmínek: vysoušecí plyn (N_2), 12 l/min; teplota plynu 350°C; tlak nebulizéru 30 psi (207 kPa).

Velikost změřených „peaků“ anandamidu pomocí hmotnostní spektrometrie byla zprůměrována pro každý příslušný vzorek ve všech měřeních. Ke statistickému hodnocení byla použita jednocestná analýza rozptylu ANOVA s následným post-hoc testem (Student-Newman-Keuls) na hladině statistické významnosti $P < 0,05$.

5 Výsledky

5.1.1 Produkce anandamidu *in vitro* po exogenním podání jeho prekurzoru N-arachidonoylfosfatidylethanolaminu (20:4-NAPE)

Pomocí hmotnostní spektrofotometrie byla v sérii *in vitro* experimentů analyzována možná produkce anandamidu po aplikaci 20 μM a 200 μM 20:4-NAPE na míšní řezy. V pokusech s podáním 20 μM 20:4-NAPE nepřesáhla hladina AEA spodního detekčního limitu metody (data nejsou zobrazena). Další experimenty byly provedeny s vyšší koncentrací 20:4-NAPE (200 μM). Za kontrolních podmínek, pouze s extracelulárním roztokem, koncentrace AEA byla prakticky na úrovni detekčního limitu použité metody. Po podání 20:4-NAPE došlo k signifikantnímu nárůstu hladiny AEA, přičemž maximální úroveň bylo dosaženo ve vzorku odebraného s 20:4-NAPE (8400 ± 1950 plochy pod křivkou, $p < 0,01$, $n=5$; Obrázek 10). V následujících dvou vzorcích z vymývání koncentrace AEA klesala, nicméně stále byla vysoko nad detekčním limitem ($7876 \pm 3192 \cdot 10^3$, $p < 0,01$; respektive $4353 \pm 1643 \cdot 10^3$, $p=0,065$; $n=5$; Obrázek 10).



Obrázek 10 Množství AEA po exogenním podání 20:4-NAPE Aplikace 20:4-NAPE vyvolala nárůst koncentrace AEA v míšních řezech. Za kontrolních podmínek s ECS (před aplikací NAPE) byla koncentrace AEA nižší než detekční možnosti této metody. Podání NAPE 200

μM do míšních řezů výrazně zvýšilo koncentraci AEA. Nejvyšší koncentrace anandamidu bylo dosaženo v přítomnosti NAPE (** $p < 0,01$; $n=5$). Hladina AEA byla zvýšená i během vymývací periody (** $p < 0,01$). Plocha pod křivkou (peak area, osa y) je udávána v tisícinásobcích ($\cdot 10^3$).

5.2 Úloha prekursoru anandamidu N-arachidonoylfosfatidylethanolaminu (20:4-NAPE) v modulaci nociceptivní signalizace - mEPSC

5.2.1 Obecná charakteristika neuronů snímaných pro mEPSC

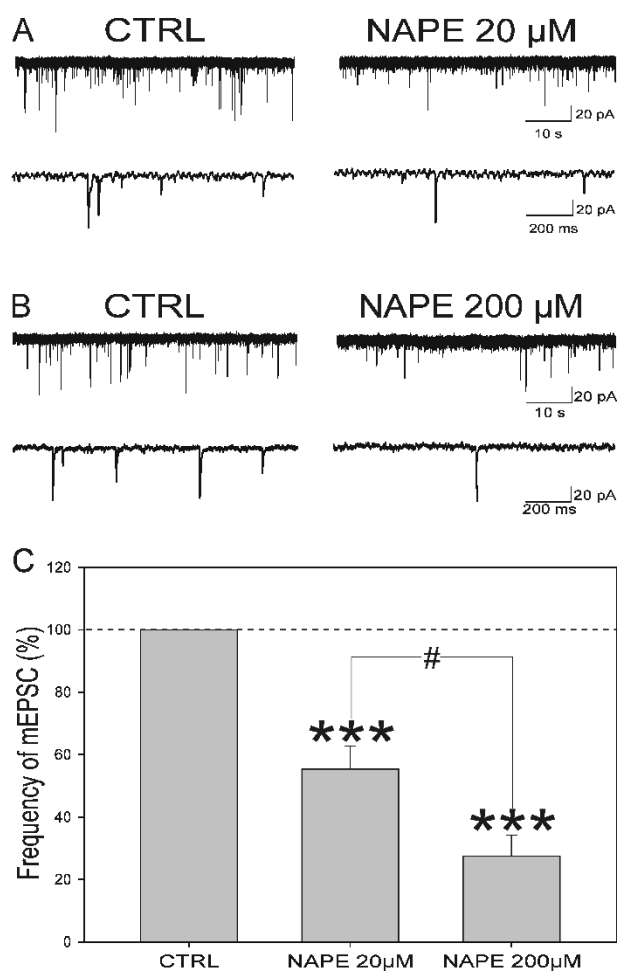
V těchto elektrofyziologických experimentech bylo analyzováno 88 neuronů ze superficiální oblasti zadního rohu míšního. Základní frekvence mEPSC neuronů ze zdravých zvířat byla $0,99 \pm 0,13$ Hz ($n = 53$). V další skupině zvířat byl navozen periferní zánět 1 den před vlastním elektrofyziologickým měřením. Neurony v této skupině měly vyšší bazální frekvenci ($1,16 \pm 0,13$ Hz; $n=35$). Rozdíl mezi těmito skupinami však nebyl statisticky signifikantní ($p=0,375$). Analýza amplitud mEPSC neukázala žádný signifikantní rozdíl mezi neurony ze zdravých zvířat ($22,8 \pm 1,1$ pA, $n=53$) při aplikaci kontrolního roztoku (TTX, bikukulin a strychnin) a neurony ze zvířat s periferním zánětem při stejné aplikaci ($24,9 \pm 1,4$ pA, $n=35$).

Celkově 80 z těchto neuronů (91 %) zvýšilo svoji aktivitu po aplikaci $0,2 \mu\text{M}$ kapsaicinu o více než 20 %. Tato reakce na kapsaicin ukazuje na přítomnost presynaptických TRPV1 receptorů u těchto neuronů.

5.2.2 Aplikace 20:4-NAPE vedla ke snížení frekvence mEPSC v neuronech zadních rohů míšních

Vliv 20:4-NAPE na frekvenci mEPSC v DH neuronech byl ověřován dvěma různými koncentracemi ($20 \mu\text{M}$ a $200 \mu\text{M}$; aplikace po dobu 4 min.). Aplikace nižší koncentrace 20:4-NAPE ($20 \mu\text{M}$) vyvolala velmi silné snížení frekvence mEPSC ($55,3 \pm 7,4$ % bazální aktivity, $n=15$, $p<0,001$; Obrázek 11A). Podání 20:4-NAPE signifikantně neovlivnilo amplitudy mEPSC ve srovnání s kontrolní hodnotou (kontrolní amplituda $29,2 \pm 2,4$ pA; amplituda po podání 20:4-NAPE $27,3 \pm 2,8$ pA, $n=15$; $p = 0,191$).

Inhibiční působení 20:4-NAPE bylo ještě zřetelnější po aplikaci vyšší koncentrace (20:4-NAPE, $200 \mu\text{M}$: $27,5 \pm 6,8$ %, $n=9$, $p<0,001$; Obrázek 11B). Rozdíl mezi aplikací vysoké ($200 \mu\text{M}$) a nízké ($20 \mu\text{M}$) koncentrace byl statisticky významný ($p<0,05$, Obrázek 11C).



Podání 20:4-NAPE ve 200 μM koncentraci také signifikantně snížilo amplitudu mEPSC (kontrolní amplituda $21,7 \pm 2,1$ pA; amplituda po podání 20:4-NAPE $16,8 \pm 1,9$ pA, $n=9$, $p<0,001$).

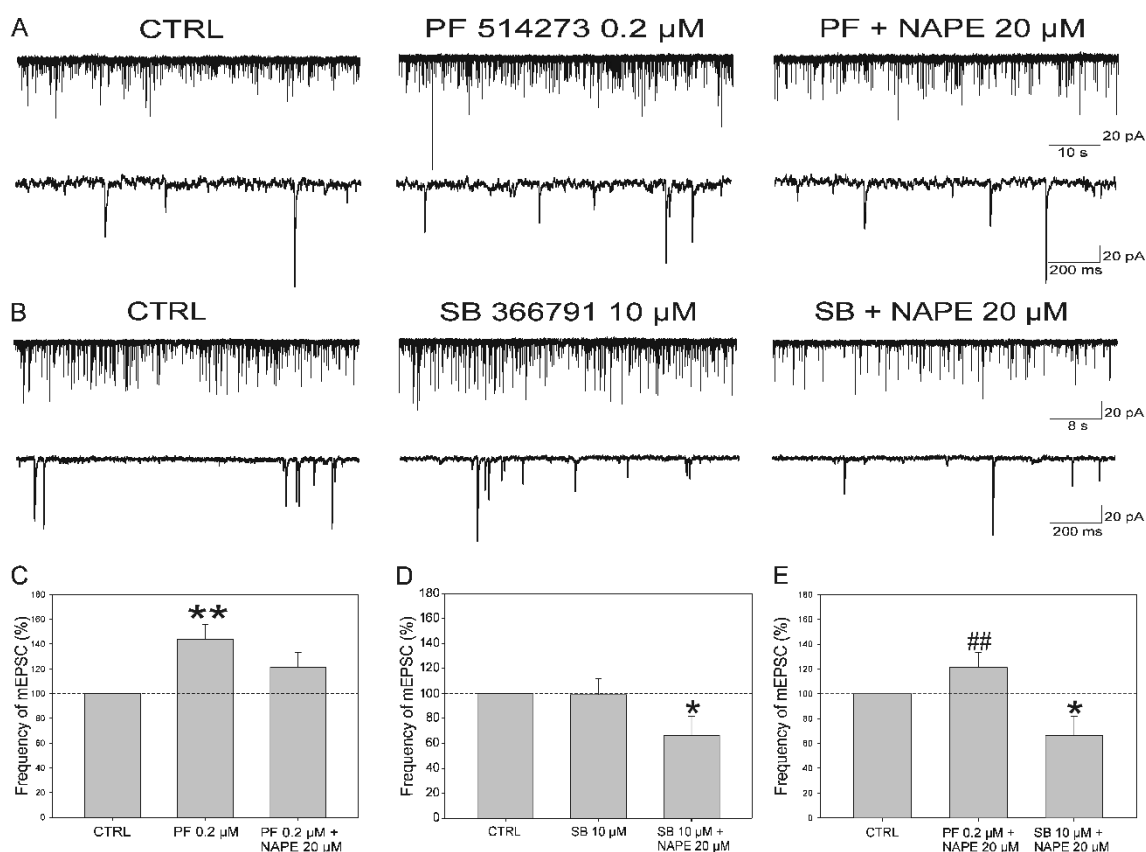
Obrázek 11 Aplikace 20:4-NAPE vedla k masivnímu snížení frekvence mEPSC v akutních míšních řezech. A a B: Ukázkové záznamy elektrofyziologického snímání před (CTRL) a během aplikace 20 a 200 μM 20:4-NAPE. C: Pokles frekvence mEPSC po podání 20 μM 20:4-NAPE byl statisticky velmi významný ($n=15$, $***p<0,001$), přičemž aplikace 200 μM 20:4-NAPE vedla k ještě silnější inhibici frekvence mEPSC ($n=9$, $***p<0,001$, $\#p<0,05$).

5.2.3 Inhibičnímu efektu 20:4-NAPE na mEPSC zabránila aplikace CB1 antagonisty, ne však TRPV1 antagonisty

Následující experimenty testovaly možné zapojení CB1 receptorů do inhibice frekvence mEPSC po podání 20:4-NAPE. Selektivní antagonist CB1 receptorů PF514273 (0,2 μM) byl aplikován po dobu 6 minut před podáním 20:4-NAPE. Frekvence mEPSC vzrostla po podání PF514273, ve srovnání s kontrolní hladinou ($143,7 \pm 11,9$ %, $n=15$, $p<0,01$; Obrázek 12A, C), což naznačuje konstitutivní aktivaci CB1 receptorů podílející se na míšní transmissi signálu. Následná společná aplikace 20:4-NAPE (20 μM) s PF514273 (0,2 μM) po dobu 4 minut nesignifikantně snížila frekvenci na $85,8 \pm 6,7$ % ve srovnání s předcházejícím podáním PF514273 ($n=15$; $p=0,05354$). Toto snížení představovalo $121,3 \pm 12,8$ % bazální frekvence ($n=15$; $p=0,054$; Obrázek 12A, C), avšak u třinácti (13) z patnácti snímaných neuronů nedošlo během ko-aplikace 20:4-NAPE a CB1 antagonisty k inhibici. Amplituda mEPSC zůstala po celou dobu snímání nezměněna (kontrolní amplituda: $23,3 \pm 1,2$ pA; amplituda po podání PF514273: $22,8 \pm 1,4$ pA; amplituda po podání PF514273 + 20:4-NAPE: $22,5 \pm 1,0$ pA; $n=15$; $p=0,622$).

Za použití selektivního antagonisty TRPV1 receptorů SB366791 (10 μ M; 6 min.) byla sledována potenciální role TRPV1 receptorů v inhibici navozené 20:4-NAPE. Způsob aplikace byl stejný jako v případě CB1 antagonisty. Frekvence mEPSC nebyla ovlivněna podáním SB366791 ($99,0 \pm 12,6$ %; $n=14$; $p=0,939$; Obrázek 12B, D). Následná ko-aplikace 20:4-NAPE (20 μ M) se SB366791 (10 μ M) vedla k významnému snížení frekvence mEPSC ($66,4 \pm 15,4$ %; $n=14$, $p<0,05$; Obrázek 12B, D), odpovídajícímu poklesu po podání 20:4-NAPE bez přítomnosti antagonisty ($p=0,513$). Podání antagonisty TRPV1 receptorů nezměnilo amplitudu mEPSC (kontrolní amplituda: $23,1 \pm 1,9$ pA; amplituda po podání SB366791: $21,2 \pm 1,8$ pA; amplituda po podání PF514273 + 20:4-NAPE: $20,2 \pm 1,5$ pA; $n=14$; $p=0,110$).

Tyto pokusy naznačují, že za fyziologických podmínek je inhibiční účinek 20:4-NAPE na frekvenci mEPSC zprostředkován především CB1 receptory (Obrázek 12).



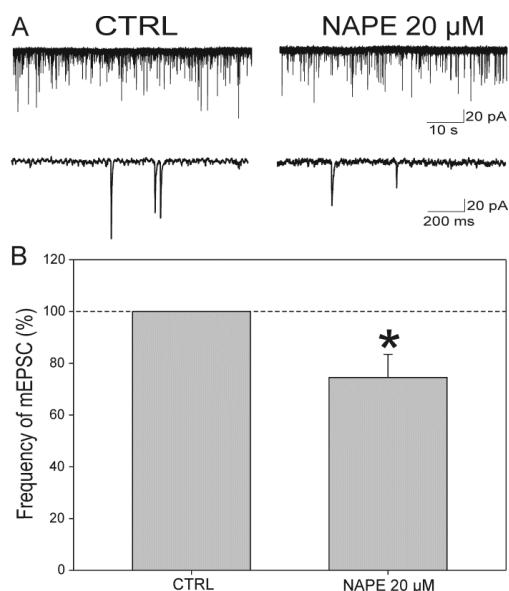
Obrázek 12 Účinek antagonistů CB1 a TRPV1 receptorů na inhibici frekvence mEPSC vyvolanou podáním 20:4-NAPE za kontrolních podmínek. Aplikace PF514273 (0,2 μ M) významně zvýšila frekvenci snímaných mEPSC, jak ukazuje příklad nativního záznamu (A) a graf s průměrnými hodnotami (C, ** $p<0,01$). Další ko-aplikace PF514273 (0,2 μ M) a NAPE (20 μ M) nevyvolala žádnou významnou změnu, přičemž frekvence mEPSC klesla blíže k bazální hladině (A, C; $n=15$). Aplikace SB 366791 (10 μ M) nezměnila frekvenci ve srovnání se základní aktivitou (B, D; $n=14$). Během následné ko-aplikace SB 366791 (10 μ M) s NAPE (20 μ M) došlo k poklesu frekvence mEPSC, podobnou inhibici při podání NAPE bez jakéhokoliv antagonisty (B, D; $n=14$, * $p<0,05$). Souhrnný graf (E) ukazuje, že CB1 antagonist (PF514273; 0,2 μ M) zabránil

inhibičnímu účinku 20:4 NAPE, zatímco podání antagonisty TRPV1 receptoru (SB366791; 10 μ M) nikoliv ($###p < 0,01$ při porovnání s ko-aplikací SB 366791, 10 μ M a 20:4-NAPE, 20 μ M; $*p < 0,05$ ve srovnání se základní hladinou).

5.2.4 V modelu periferního zánětu inhibičnímu působení NAPE zabránila aplikace antagonisty TRPV1 receptorů, ne však aplikace antagonisty CB1 receptorů

K navození periferního zánětu byla použita subkutánní injekce směsi kaolinu a karageenanu do zadních tlap potkana. Vliv 20:4-NAPE (20 μ M, 4 min.) byl testován až po objevení příznaků zánětu (zarudnutí, zvýšená tepelná citlivost a otok) – po 24 hodinách od injekce. Odpovědi na tepelné podněty byly významně zkráceny ($p < 0,01$; $n = 32$) z $12,11 \pm 1,4$ s (před aplikací injekce) na průměr $8,39 \pm 0,80$ s (24 hodin po injekci).

Elektrofyzilogické testování vlivu 20:4-NAPE ukázalo silný inhibiční efekt na frekvenci miniaturních postsynaptických proudů v 10 z 12 snímaných neuronů ($74,5 \pm 8,9$ %, $n = 12$, $p < 0,05$; Obrázek 13A). Tento výsledek je podobný poklesu frekvence v kontrolních neuronech (statistické hodnocení neukázalo žádné rozdíly v míře inhibice mezi neurony z kontrolních zvířat a neurony ze zvířat s jednodenním periferním zánětem; $p = 0,106$). Podání 20:4-NAPE nezměnilo amplitudy mEPSC ve srovnání s bazální hodnotou (kontrolní amplituda $26,5 \pm 2,0$ pA; amplituda po podání 20:4-NAPE $26,1 \pm 2,2$ pA, $n = 12$; $p = 0,233$).



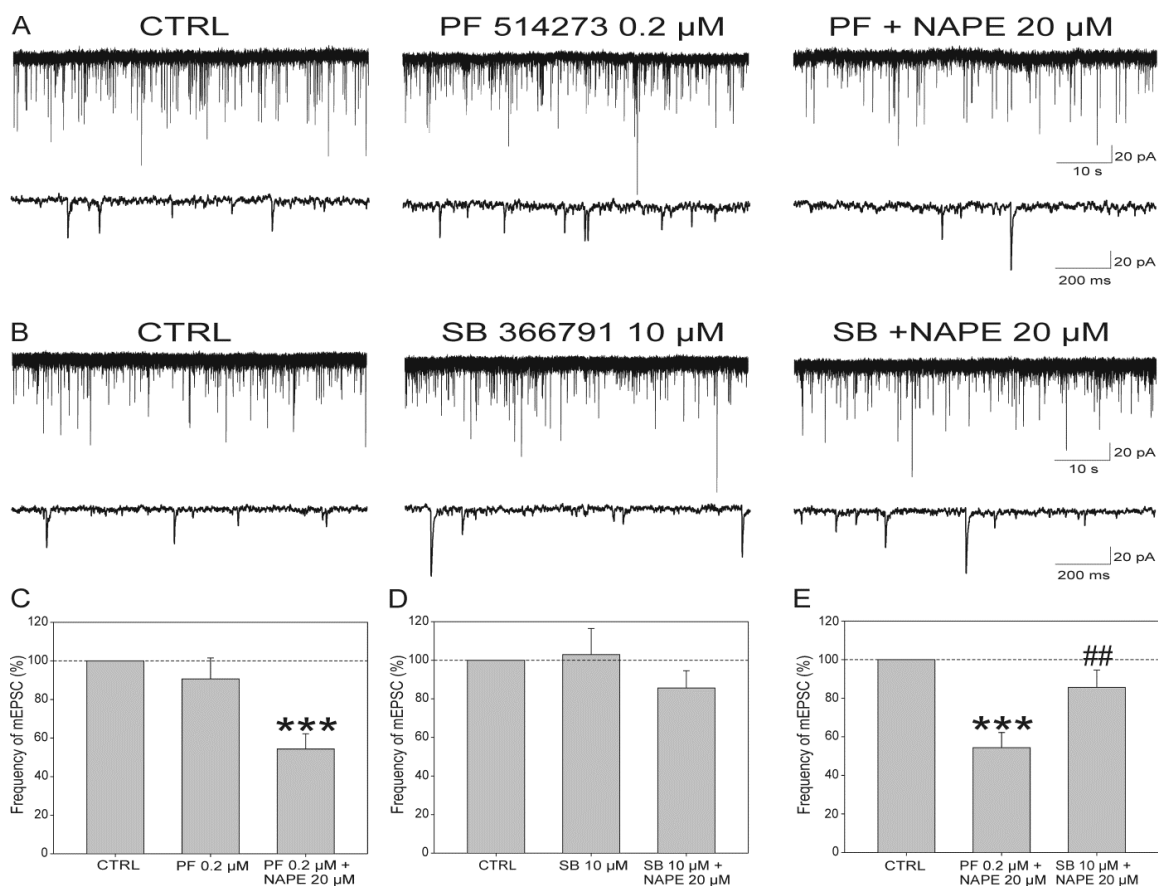
Obrázek 13 Účinek 20:4-NAPE na frekvenci mEPSC na míšních řezech v modelu periferního zánětu. (A) Nativní záznam ukazuje inhibiční efekt 20:4-NAPE (20 μ M) na frekvenci mEPSC v modelu periferního zánětu. (B) Snížení frekvence bylo zaznamenáno v 10 ze 12 snímaných neuronů v akutních míšních řezech ($*p < 0,05$, $n = 12$), připravených ze zvířat s karageenanem navozeným jednodenním periferním zánětem.

Další pokusy sledovaly účinek antagonisty CB1 receptorů PF514273 (0,2 μ M, 6 min) na inhibici frekvence mEPSC na míšních řezech ze zvířat s navozeným periferním zánětem. Podání antagonisty v tomto modelu nevyvolalo žádné signifikantní změny na frekvenci mEPSC ($90,7 \pm 10,9$ %, $n = 10$, $p > 0,05$; Obrázek 14A, C). Následně byl antagonist PF514273 (0,2 μ M) aplikován společně s NAPE (20 μ M) po dobu 4 minut.

Tato ko-aplikace vedla k signifikantnímu snížení frekvence mEPSC ve všech testovaných neuronech ($54,3 \pm 7,9 \%$, $n=10$, $p<0,001$; Obrázek 14A, C). Tyto výsledky naznačují, že konstitutivní aktivita CB1 receptorů, pozorovaná za kontrolních podmínek, je zde potlačena a CB1 receptory se nepodílejí na inhibičním účinku 20:4-NAPE za podmínek periferního zánětu. Během celého experimentu nedošlo k významné změně amplitudy mEPSC (kontrolní amplituda: $26,1 \pm 3,6$ pA; amplituda po podání PF514273: $24,9 \pm 3,1$ pA; amplituda po podání PF514273 + 20:4-NAPE: $26,1 \pm 3,3$ pA; $n=10$; $p=0,555$).

Ve třetí sérii experimentů byl testován účinek antagonisty TRPV1 receptorů za podmínek periferního zánětu. Nejprve byl aplikován selektivní antagonist TRPV1 receptorů SB 366791 ($10 \mu\text{M}$, 6 min.) samostatně a následně společně s NAPE $20 \mu\text{M}$ po dobu 4 minut. Aplikace SB 366791 nevedla k žádné změně frekvence ($102,9 \pm 13,5 \%$, $n=13$; Obrázek 14B, D). Stejně během ko-aplikace SB 366791 a NAPE se frekvence mEPSC udržela blízko základní aktivity neuronů ($85,6 \pm 8,9 \%$, $n=13$; Obrázek 14B, D). Během obou aplikací (SB366791 samostatně a v kombinaci s 20:4-NAPE) došlo ke statisticky nevýznamnému poklesu amplitudy mEPSC (kontrolní amplituda: $23,9 \pm 2,4$ pA; amplituda po podání SB 366791: $20,4 \pm 1,3$ pA; amplituda po podání SB 366791 + 20:4-NAPE: $20,3 \pm 1,2$ pA; $n=13$; $p=0,054$).

Tyto výsledky naznačují, že inhibiční účinek NAPE na četnost mEPSC je za kontrolních podmínek zprostředkován především CB1 receptory a TRPV1 receptory v modelu periferního zánětu. Aplikace TRPV1 antagonisty a následné jeho podání s NAPE se signifikantně odlišuje od neuronů testovaných na účinek samostatně podaného NAPE a jeho ko-administrace s PF514273 ($p<0,01$; Obrázek 14E).



Obrázek 14 Účinek antagonistů CB1 a TRPV1 receptorů na inhibici frekvence mEPSC vyvolanou podáním 20:4-NAPE na modelu periferního zánětu. Aplikace PF514273 (0,2 μ M) nevedla k žádným významným změnám frekvence mEPSC ($90,7 \pm 10,9$ %, $n=10$). Následná koaplikace PF514273 (0,2 μ M) a NAPE (20 μ M) vyvolala silnou inhibici ($n=10$, $***p<0,001$; A, C). Frekvence mEPSC se nezměnila během aplikace SB 366791 (10 μ M, $n=13$; B, D). Společné podání tohoto antagonisty s NAPE (20 μ M) udrželo frekvenci mEPSC téměř na stejné úrovni ($n=13$; B, D). (E) Koaplikace antagonisty TRPV1 receptorů (SB 366791 10 μ M) s NAPE zabránila inhibičnímu účinku NAPE za podmínek zánětu ($***p<0,001$ ve srovnání s bazální frekvencí; $##p<0,01$ ve srovnání se skupinou koaplikace 20:4-NAPE s CB1 antagonistou).

5.3 Úloha prekursoru anandamidu N-arachidonoylfosfatidylethanolaminu (20:4-NAPE) v modulaci nociceptivní signalizace – sEPSC

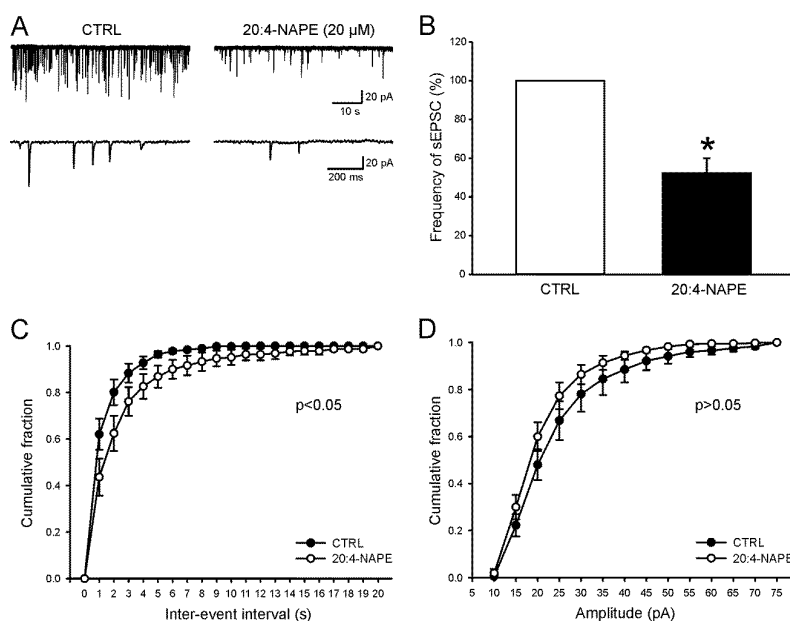
5.3.1 Obecná charakteristika neuronů snímaných pro sEPSC

V elektrofyziologických experimentech snímání sEPSC bylo analyzováno celkem 98 neuronů ze superficiální oblasti zadního rohu míšního. Základní frekvence sEPSC neuronů ze zdravých zvířat byla $1,09 \pm 0,14$ Hz ($n = 42$). Ve druhé skupině zvířat byl navozen periferní zánět 1 den před vlastním elektrofyziologickým měřením. Neurony v této skupině vykazovaly vyšší bazální frekvenci ($1,28 \pm 0,24$ Hz; $n=56$), nikoliv však na hladině statistické významnosti.

U 87 % ze snímaných neuronů ($n=76$) byl aplikován $0,2 \mu\text{M}$ kapsaicin. Z těchto neuronů jich 92 % ($n=70$) reagovalo nárůstem frekvence sEPSC o více než 20 %. Tato reakce na kapsaicin ukazuje na přítomnost presynaptických TRPV1 receptorů u těchto neuronů.

5.3.2 Aplikace 20:4-NAPE vedla ke snížení frekvence sEPSC v neuronech zadních rohů míšních

Podání 20:4-NAPE ($20 \mu\text{M}$; po dobu 4 min.) masivně snížila frekvenci sEPSC ve 12 ze 13 snímaných neuronů ($52,3 \pm 7,8$ % bazální aktivity, $n=13$, $p<0,001$; Obrázek 15A, B, C). Aplikace 20:4-NAPE také signifikantně snížila amplitudu sEPSC z $24,9 \pm 2,5$ pA na $21,4 \pm 1,4$ pA ($n=13$, $p<0,05$, párový t-test), avšak pokles amplitudy >15 % byl přítomen pouze u 4 buněk ze 13 neuronů. Kumulativní analýza distribuce amplitudy sEPSC neukázala žádné signifikantní změny po aplikaci 20:4-NAPE (Obrázek 15D).



Obrázek 15 Aplikace 20:4-NAPE vedla k masivnímu snížení frekvence sEPSC v akutních míšních řezech.

(A) Ukázkové záznamy elektrofyziologického snímání sEPSC před aplikací (CTRL) a během aplikace $20 \mu\text{M}$ 20:4-NAPE. (B) Aplikace 20:4-NAPE ($20 \mu\text{M}$) výrazně snížila průměrnou frekvenci sEPSC ($n=13$, $*p<0,05$, Wilcoxonův znaménkový test). (C) Tento výsledek je také zřejmý z analýzy kumulativního histogramu ($p<0,05$, Kolmogorovův-Smirnovův test). (D) Snížení amplitudy sEPSC se neprokázalo signifikantně významné na základě kumulativní amplitudové analýzy.

5.3.3 Inhibičnímu efektu 20:4-NAPE na spontánní aktivitu zabránila aplikace CB1 antagonisty, ne však TRPV1 antagonisty

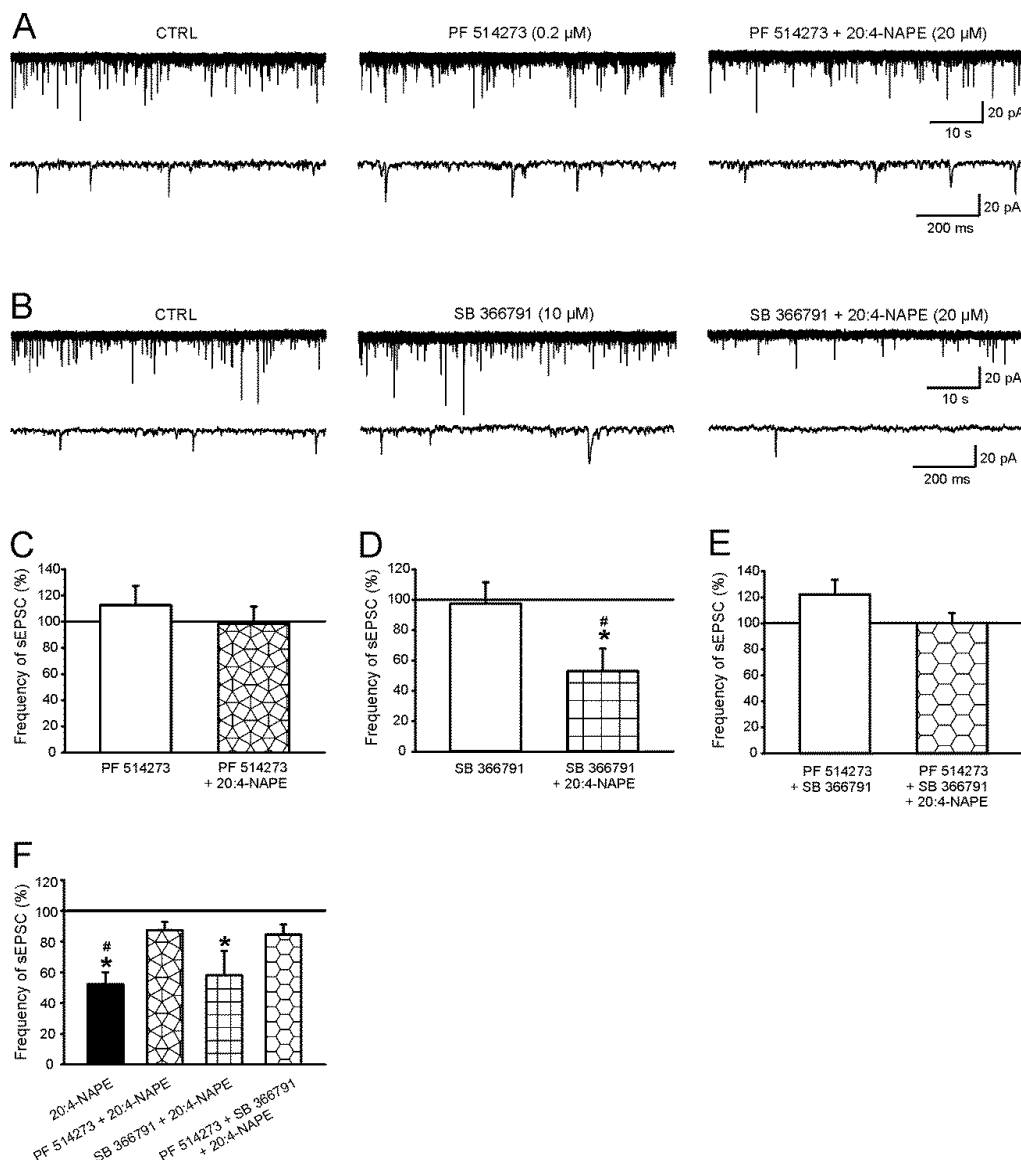
Následující série experimentů testovala, zda inhibice vyvolaná 20:4-NAPE je zprostředkována některým z hlavních receptorů vázících anandamid, tedy CB1 a TRPV1 receptory.

Vysoce selektivní antagonist CB1 receptorů PF514273 (0,2 μ M; 6 min. aplikace) vyvolal malé zvýšení frekvence sEPSC, které však nedosáhlo hladiny statistické významnosti ($112,6 \pm 14,8\%$, $n=11$; Obrázek 16A, C). Následná ko-administrace PF514273 (0,2 μ M) a 20:4-NAPE (20 μ M, 4 min. aplikace) nevedla ke změně frekvence spontánní aktivity ve srovnání s kontrolní hladinou a úrovní při podání antagonisty ($98,1 \pm 13,4\%$; Obrázek 16A, C, F). Amplituda sEPSC nebyla ovlivněna ani aplikací antagonisty CB1 receptoru ani následnou ko-aplikací PF514273 a 20:4-NAPE (kontrolní amplituda: $20,0 \pm 1,7$ pA; amplituda po podání PF514273: $18,8 \pm 1,8$ pA; amplituda po podání PF514273 + 20:4-NAPE: $18,6 \pm 2,1$ pA; $n=11$).

Podání selektivního antagonisty TRPV1 receptorů SB366791 (10 μ M; 6 min. aplikace) nezměnilo frekvenci sEPSC ($97,6 \pm 13,9\%$, $n=10$; Obrázek 16B, D). Nicméně společná aplikace 20:4-NAPE (20 μ M) se SB366791 (10 μ M; 4 min) signifikantně snížila frekvenci sEPSC u 8 z 10 snímaných neuronů ($53,0 \pm 14,7\%$, $n=10$; Obrázek 16B, D) ve srovnání s kontrolní úrovní. Míra poklesu frekvence byla velmi podobná jako při aplikaci samotné 20:4-NAPE (Obrázek 15B). Amplituda sEPSC nebyla signifikantně změněna ani jednou aplikací (kontrolní amplituda: $29,0 \pm 4,1$ pA; amplituda po podání SB366791: $24,6 \pm 4,0$ pA; amplituda po podání SB366791 + 20:4-NAPE: $25,2 \pm 4,6$ pA; $n=10$).

Dále byla použita kombinace antagonistů obou receptorů PF514273 (0,2 μ M) a SB366791 (10 μ M, 6 min. aplikace) před společným podáním s 20:4-NAPE. Ko-administrace PF514273 a SB366791 vedla k nesignifkantnímu nárůstu frekvence spontánní aktivity ($122,0 \pm 11,4\%$, $n=8$; Obrázek 16E). Následné podání těchto antagonistů (0,2 μ M PF514273 a 10 μ M SB366791) s 20:4-NAPE (20 μ M) nezměnilo frekvenci sEPSC ve srovnání s kontrolní úrovní ($100,2 \pm 7,6\%$; Obrázek 16E). Průměrná amplituda zůstala v průběhu experimentu nezměněna (kontrolní amplituda: $20,8 \pm 2,0$ pA; amplituda po podání PF514273 + SB366791: $19,2 \pm 1,6$ pA; amplituda po podání PF514273 + SB366791 + 20:4-NAPE: $17,4 \pm 1,1$ pA; $n=8$).

Pro porovnání všech experimentálních situací a pro odlišení vlivu podání každého antagonisty zvlášť byla též analyzována data způsobem, kdy byla ko-aplikace antagonisty společně s 20:4-NAPE vyjádřena relativně, v procentech předchozí aplikace (Obrázek 16F): PF514237 + 20:4-NAPE v porovnání s podáním PF514273 ($87,5 \pm 5,3\%$, $n=11$); SB366791 + 20:4-NAPE v porovnání s podáním SB366791 ($58,1 \pm 16,0\%$, $n=10$) a PF514237 + SB366791 + 20:4-NAPE porovnán s podáním obou antagonistů dohromady ($84,6 \pm 6,6\%$, $n=8$). Tato data potvrdila odlišné působení obou antagonistů. Celá série experimentů dohromady ukazuje, že inhibice frekvence sEPSC navozená podáním 20:4-NAPE je zprostředkována aktivací CB1 receptorů, ale ne TRPV1 receptorů.

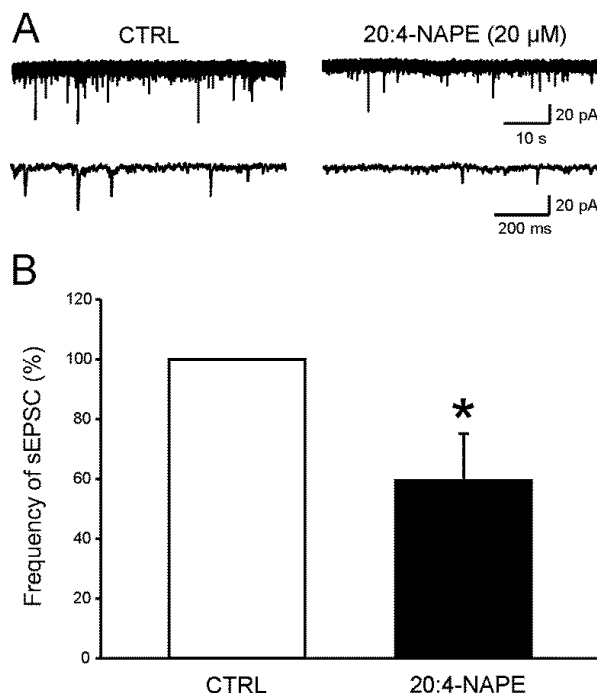


Obrázek 16 Účinek antagonistů CB1 a TRPV1 receptorů na inhibici frekvence sEPSC vyvolanou podáním 20:4-NAPE za kontrolních podmínek. (A, C) Administrace PF514273 (0,2 μ M) významně nezměnila frekvenci sEPSC ($n=11$). Následná společná aplikace PF514273 (0,2 μ M) a NAPE (20 μ M) zabránila inhibičnímu působení 20:4-NAPE na frekvenci sEPSC; při tomto podání se frekvence nelišila od kontrolní hladiny ($n=11$). (B, D) Během aplikace 10 μ M SB366791 nedošlo ke změně frekvence sEPSC, avšak následná ko-aplikace 10 μ M SB366791 a 20 μ M 20:4-NAPE významně snížila frekvenci sEPSC (* $p<0,05$ v porovnání s kontrolní hladinou, # $p<0,05$ v porovnání s podáním samotného SB366791; ANOVA pro opakovaná měření aplikovaná na pořadí, následovaná Student-Newman-Keulovým testem). (E) Společná aplikace PF514273 (0,2 μ M) a SB366791 (10 μ M) nevyvolala žádnou významnou změnu ve frekvenci sEPSC ($n=8$). Následná administrace PF514273 (0,2 μ M), SB366791 (10 μ M) s 20:4-NAPE (20 μ M) zablokovala inhibici indukovanou podáním samotného 20:4-NAPE. (F) Výše uvedená data vyjádřená v procentech předcházející aplikace: Podání 20:4-NAPE ($n=13$; * $p<0,05$, Wilcoxonův znaménkový test) ve srovnání s bazální frekvencí sEPSC; PF514273 + 20:4-NAPE ($n=11$) proti podání PF514273; SB366791 + 20:4-NAPE ($n=10$, * $p<0,05$, Wilcoxonův znaménkový test) proti SB366791; PF514273 + SB366791 + 20:4-NAPE ve srovnání s podáním obou antagonistů společně ($n=8$). Statisticky významný rozdíl je též mezi podáním samotného 20:4-NAPE a PF514273 + 20:4-NAPE: # $p<0,05$, jednocestná ANOVA s následným Student-Newman-Keulovým testem.

5.3.4 Aplikace 20:4-NAPE snížila frekvenci sEPSC v neuronech zadních rohů míšních za podmínek periferního zánětu.

K navození periferního zánětu byla použita subkutánní injekce směsi kaolinu a karageenanu do zadních tlap potkana 24 hodin před behaviorálním testováním. Příznaky zánětu (zarudnutí, zvýšená tepelná citlivost a otok) byly přítomny na zadních tlapách u všech zvířat. Odpovědi na tepelné podněty byly významně zkráceny ($p < 0,05$; $n = 12$, párový t-test) z $11,82 \pm 0,60$ s (před aplikací injekce) na průměr $8,34 \pm 0,51$ s (24 hodin po injekci).

Aplikace 20:4-NAPE ($20 \mu\text{M}$, 4 min.) na míšní řezy připravené z těchto zvířat silně inhibovalo frekvenci sEPSC v 7 z 9 snímaných neuronů ($59,5 \pm 15,6$ %, $n = 9$, $p < 0,05$; Obrázek 17A). Tento výsledek je podobný poklesu frekvence v kontrolních neuronech ($52,3 \pm 7,8$ % bazální aktivity, $n = 13$; Obrázek 15A, B, C). Aplikace 20:4-NAPE také signifikantně snížila amplitudu sEPSC z $21,4 \pm 2,3$ pA na $18,4 \pm 1,4$ pA ($n = 9$, $p < 0,05$), avšak pokles amplitudy > 15 % byl přítomen pouze u 3 buněk z 9 neuronů.



Obrázek 17 Účinek 20:4-NAPE frekvenci sEPSC na míšních řezech v modelu periferního zánětu. (A) Nativní záznam sEPSC z jednoho superficiálního neuronu před a během aplikace 20:4-NAPE ($20 \mu\text{M}$) na míšní řez připravený disekcí 24 hodin po navození periferního zánětu. (B) Aplikace 20:4-NAPE ($20 \mu\text{M}$) signifikantně snížila frekvenci sEPSC ($n = 9$, $*p < 0,05$, Wilcoxonův znaménkový test).

5.3.5 Během periferního zánětu byl inhibiční vliv 20:4-NAPE na frekvenci sEPSC zprostředkován CB1 a částečně TRPV1 receptory

Zablokování CB1 a TRPV1 receptorů jejich testovalo zapojení na inhibiční účinek 20:4-NAPE po navození periferního zánětu. Antagonista CB1 receptorů PF514273 ($0,2 \mu\text{M}$; 6 min. aplikace) nevyvolal žádnou změnu frekvence sEPSC ($108,0 \pm 9,8$ %, $n = 16$; Obrázek 18A, C). Následná ko-administrace PF514273 ($0,2 \mu\text{M}$) a 20:4-NAPE ($20 \mu\text{M}$, 4 min. aplikace) nevedla k signifikantní změně frekvence spontánní aktivity ve srovnání

s kontrolní hladinou ($148,8 \pm 16,8 \%$, $n=16$; Obrázek 18A, C). Devět (9) ze 16 neuronů v tomto případě zvýšilo frekvenci sEPSC, 4 neurony frekvenci nezměnily a u 3 neuronů došlo k poklesu frekvence. Amplituda sEPSC nebyla ovlivněna ani aplikací antagonisty CB1 receptoru ani následnou ko-aplikací PF514273 a 20:4-NAPE (kontrolní amplituda: $27,4 \pm 2,4$ pA; amplituda po podání PF514273: $24,6 \pm 2,5$ pA; amplituda po podání PF514273 + 20:4-NAPE: $24,1 \pm 2,2$ pA; $n=16$).

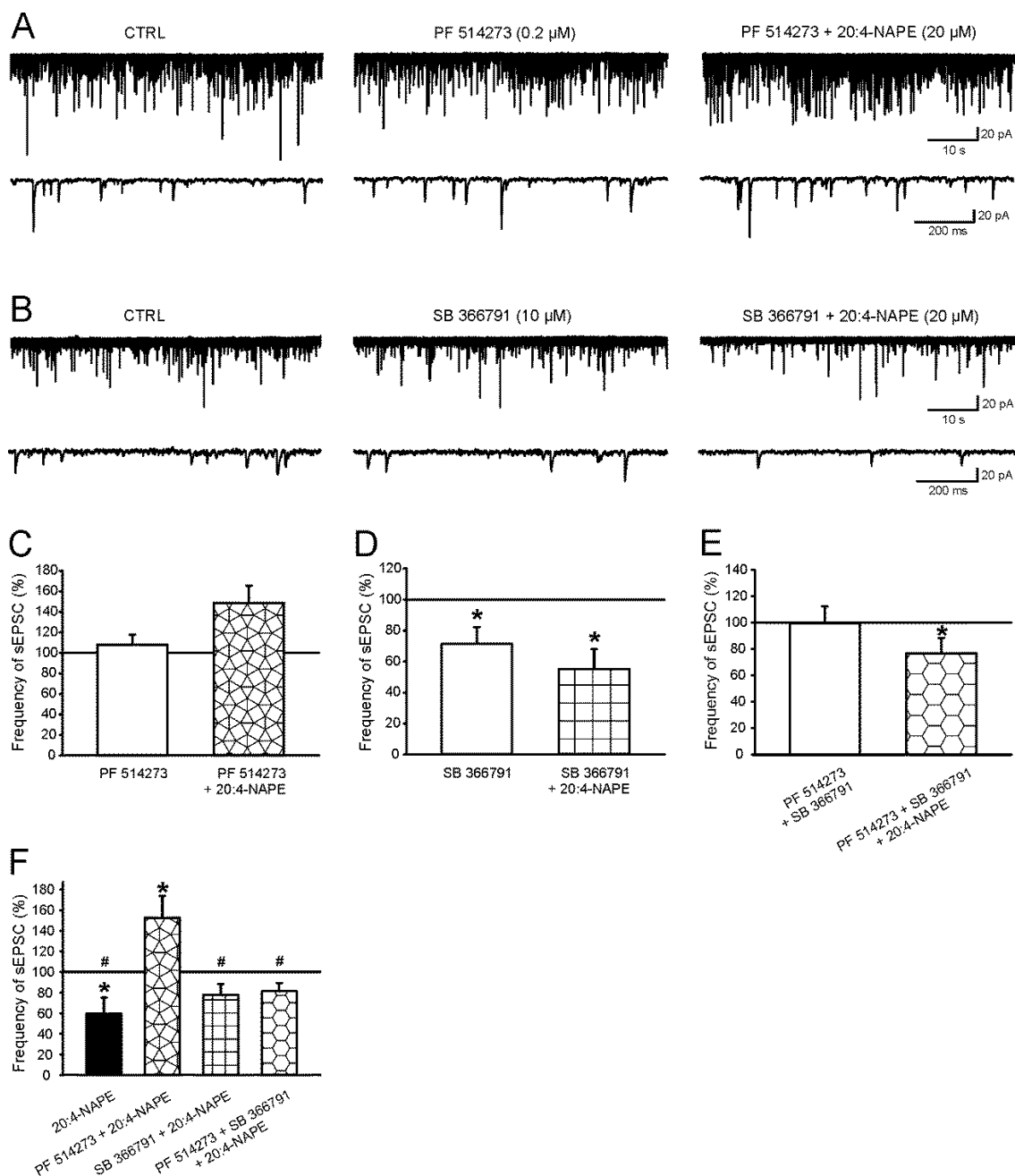
Podání selektivního antagonisty TRPV1 receptorů SB366791 ($10 \mu\text{M}$; 6 min. aplikace) významně snížilo frekvenci sEPSC ($71,5 \pm 10,9 \%$, $n=16$; Obrázek 18B, D). Následná společná aplikace 20:4-NAPE ($20 \mu\text{M}$) se SB366791 ($10 \mu\text{M}$; 4 min) vyvolala další pokles sEPSC ve srovnání s kontrolní hladinou ($55,2 \pm 12,9 \%$; Obrázek 18B, D). Rozbor odpovědí jednotlivých buněk ukázal, že 11 ze 16 neuronů vykázalo snížení frekvence sEPSC, zatímco zbývající neurony frekvenci nezměnily. Amplituda sEPSC nebyla významně změněna ani jednou aplikací (kontrolní amplituda: $24,2 \pm 1,7$ pA; amplituda po podání SB366791: $24,2 \pm 1,6$ pA; amplituda po podání SB366791 + 20:4-NAPE: $21,8 \pm 1,2$ pA; $n=16$).

V následujících experimentech byl sledován vliv kombinace obou antagonistů. Ko-administrace PF514273 a SB366791 neovlivnila frekvenci spontánní aktivity, při spojení výsledků všech snímaných neuronů dohromady ($99,6 \pm 12,7 \%$, $n=15$; Obrázek 18E). Přesto 9 ze 15 snímaných neuronů během společného podání antagonistů CB1 a TRPV1 receptorů snížilo frekvenci sEPSC ($64,9 \pm 4,8 \%$, $p<0,05$, ANOVA pro opakovaná měření aplikovaná na pořadí, následovaná Student-Newman-Keulovým testem), u 5 neuronů došlo k nárůstu frekvence sEPSC ($160,6 \pm 11,2 \%$, $p<0,05$, ANOVA pro opakovaná měření aplikovaná na pořadí). Následné podání PF514273 ($0,2 \mu\text{M}$), SB366791 ($10 \mu\text{M}$) a 20:4-NAPE ($20 \mu\text{M}$) vyvolalo snížení frekvence sEPSC ($76,9 \pm 11,6 \%$, $n=15$; Obrázek 18E) ve srovnání s kontrolní hladinou. Podání antagonistů CB1 a TRPV1 receptorů zabránilo inhibičnímu vlivu 20:4-NAPE u 7 z 15 buněk. Průměrná amplituda zůstala v průběhu experimentu nezměněna (kontrolní amplituda: $24,9 \pm 3,7$ pA; amplituda po podání PF514273 + SB366791: $23,9 \pm 3,2$ pA; amplituda po podání PF514273 + SB366791 + 20:4-NAPE: $20,0 \pm 2,8$ pA; $n=15$).

Navíc, pro srovnání celkového účinku podání 20:4-NAPE za různých experimentálních podmínek, byla data analyzována relativně, jako procenta předchozí aplikace ($=100 \%$) a rozdíly byly statisticky vyhodnoceny (Obrázek 18F). V rámci tohoto vyhodnocení má podání samotného 20:4-NAPE hodnotu $59,5 \pm 15,6 \%$ ve srovnání s kontrolní hladinou

(n=9). Frekvence sEPSC po podání PF514237 + 20:4-NAPE ve srovnání s aplikací samotného PF514237 byla výrazně zvýšena ($152,7 \pm 21,4 \%$, n=16). Naopak aplikace SB366791 + 20:4-NAPE relativně vůči podání samotného SB366791 byla $77,8 \pm 10,6 \%$ (n=16), na podobné úrovni jako PF514237 + SB366791 + 20:4-NAPE v porovnání s podáním obou antagonistů dohromady ($81,2 \pm 8,2 \%$; n=15). Nárůst frekvence po aplikaci PF514237 + 20:4-NAPE byl statisticky odlišný od všech ostatních situací.

Tyto výsledky naznačují, že inhibiční účinek na frekvenci sEPSC vyvolaný podáním 20:4-NAPE je za podmínek zánětu zprostředkován CB1 receptory (Obrázek 18F). Navíc, v případě zablokování CB1 receptorů podání 20:4-NAPE zvyšovalo frekvenci sEPSC, kterému bylo možné předejít inhibicí TRPV1 receptorů.



Obrázek 18 Účinek antagonistů CB1 a TRPV1 receptorů na inhibici frekvence sEPSC vyvolanou podáním 20:4-NAPE na modelu periferního zánětu. (A, C) Administrace PF514273 (0,2 μ M) nezměnila frekvenci sEPSC ($n=16$). Následná společná aplikace PF514273 (0,2 μ M) a NAPE (20 μ M) nesignifikantně zvýšila frekvenci sEPSC ve srovnání s kontrolní hladinou. (B,D) Frekvence sEPSC významně klesla po podání SB366791 (10 μ M, $n=16$, $*p<0,05$, ANOVA pro opakovaná měření aplikovaná na pořadí, následovaná Student-Newman-Keulovým testem). (E) Společná aplikace PF514273 (0,2 μ M) a SB366791 (10 μ M) nevyvolala žádnou změnu ve frekvenci sEPSC, následná ko-aplikace obou antagonistů s 20:4-NAPE (20 μ M) výrazně snížila frekvenci spontánních proudů ve srovnání s kontrolní hladinou ($n=15$; $*p<0,05$, ANOVA pro opakovaná měření aplikovaná na pořadí, následovaná Student-Newman-Keulovým testem). Výše uvedená data vyjádřená v procentech předcházející aplikace: Podání 20:4-NAPE ($n=9$) ve srovnání s bazální frekvencí sEPSC; PF514273 + 20:4-NAPE ($n=16$ proti podání PF514273; SB366791 + 20:4-NAPE ($n=16$) proti SB366791; PF514273 + SB366791 + 20:4-NAPE ve srovnání s podáním obou antagonistů společně ($n=5$). Statisticky signifikantní rozdíly: $*p<0,05$ daná aplikace proti kontrolní hladině (Wilcoxonův znaménkový test); $\#p<0,05$, daná aplikace proti PF514273 + 20:4-NAPE (jednocestná ANOVA s následným Student-Newman-Keulovým testem).

5.4 Úloha prozánětlivého cytokinu TNF α v modulaci nociceptivní signalizace

V této sérii experimentů byly snímány spontánní a miniaturní AMPA EPSC. Porovnávány byly snímání těchto EPSC u kontrolních míšních řezů a na míšních řezech pět dní po přetěti sedací nervu. Část míšních řezů byla navíc inkubována před vlastním snímáním v TNF α (60 nM).

Frekvence sEPSC byla $2,83 \pm 0,83$ Hz u neuronů zadních rohů míšních po provedení axotomie a po aplikaci TTX (mEPSC) klesla na $1,52 \pm 0,34$ Hz ($n=18$, $p<0,001$). Snímání z řezů u kontrolních zvířat ukázalo, že TTX snížil frekvenci sEPSC z $1,23 \pm 0,20$ Hz na $0,94 \pm 0,17$ Hz ($n = 20$, $p<0,01$, Obrázek 19B, D). Spontánní i miniaturní proudy neuronů na míšních řezech po axotomii byly vyšší než u kontrolních zvířat. Tento rozdíl však nedosáhl hladiny statistické významnosti.

U řezů po axotomii inkubované v TNF α dosáhla absolutní frekvence sEPSC $7,89 \pm 2,21$ Hz, která signifikantně poklesla po aplikaci TTX – $1,83 \pm 0,40$ Hz ($n=12$, $p<0,001$). Frekvence spontánních EPSC na kontrolních řezech po inkubaci v TNF α klesla z $2,03 \pm 0,53$ Hz na $1,45 \pm 0,25$ Hz ($n=9$, $p<0,05$, Obrázek 19 B, D). Je zřejmé, že TNF α mělo výraznější účinek na sEPSC u míšních řezů po provedení axotomie ve srovnání s kontrolními řezy ($p < 0,05$), na rozdíl od nesignifikantního rozdílu mEPSC mezi oběma skupinami (Obrázek 19C, D). Tyto výsledky naznačují, že TNF α zvyšuje frekvenci sEPSC neuronů po axotomii skrze posílení aktivity TTX-senzitivních Na $^+$ kanálů. Tento jev je ještě zřetelnější při standardizaci výsledků (frekvence sEPSC = 100 %): V tomto případě tetrodotoxin snížil frekvenci spontánních EPSC na $64,4 \pm 6,4$ % ($n=18$, $p<0,001$) u neuronů po axotomii, avšak bez inkubace v TNF α . U axotomizovaných neuronů po inkubaci v TNF α tetrodotoxin vyvolal pokles na $37,4 \pm 6,9$ % původní hladiny ($n=12$, $p<0,001$; Obrázek 19E). Tento masivní pokles frekvence sEPSC indukovaný TTX po inkubaci s TNF α je signifikantně odlišný od neinkubovaných axotomizovaných řezů ($p<0,01$) a také od účinku tetrodotoxinu v kontrolních řezech ($p<0,001$). U kontrolních zvířat nebyl pozorován rozdíl v účinku TTX na frekvenci sEPSC při porovnání inkubace v TNF α ($80,9 \pm 6,6$ %, $n=9$, $P < 0,05$) a bez této inkubace ($77,8 \pm 6,4$ %, $n=20$, $p<0,01$).

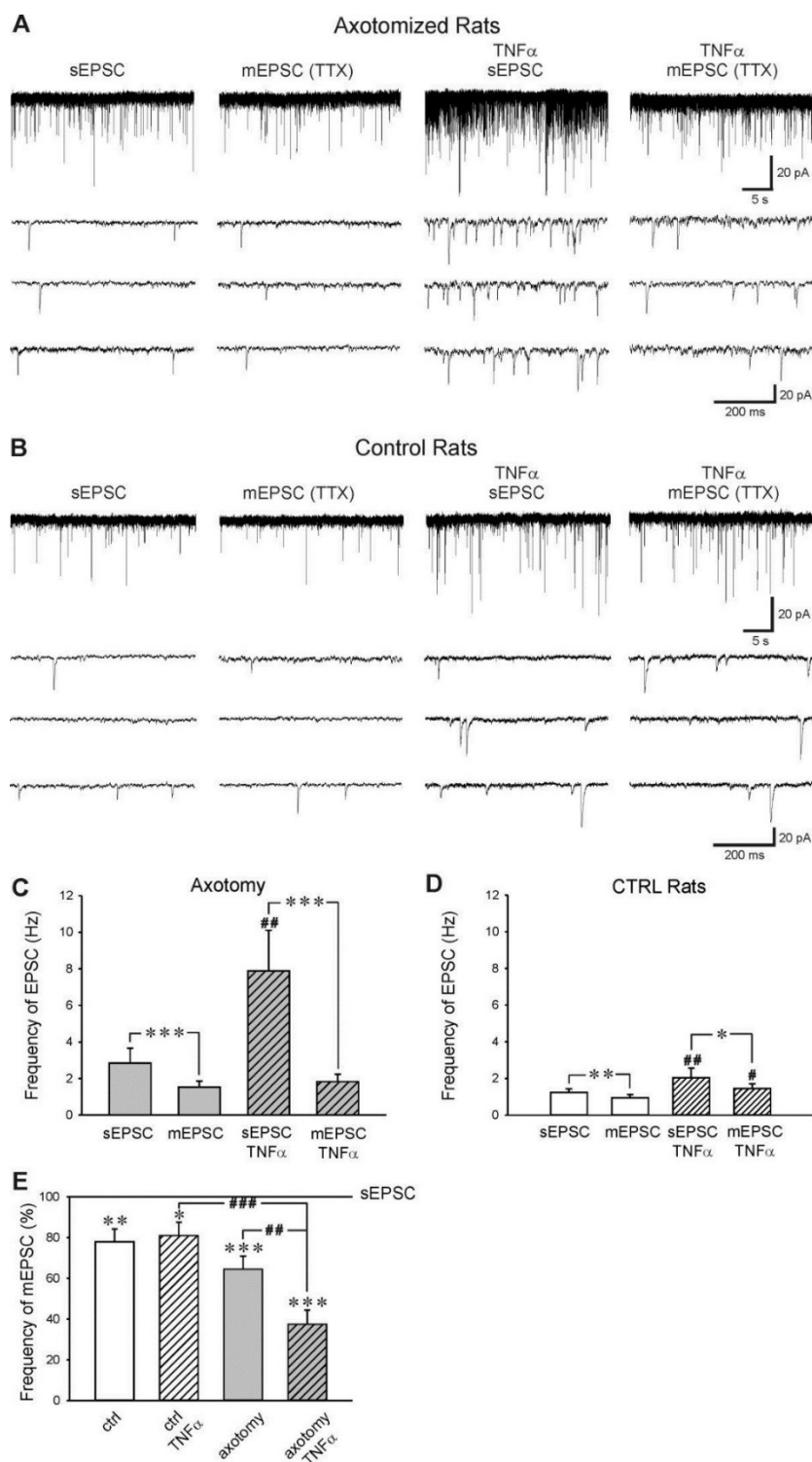
Průměrná amplituda sEPSC byla $29,7 \pm 2,5$ pA v neuronech po axotomii a snížila se na $25,2 \pm 2,0$ pA (mEPSC) po aplikaci TTX ($n=18$, $p<0,001$, Obrázek 20A). Ve skupině neuronů navíc inkubovaných v TNF α byly výsledky podobné – amplituda sEPSC dosahovala $35,2 \pm 4,7$ pA, zatímco amplituda mEPSC byla $28,6 \pm 3,0$ pA ($n=12$, $p < 0,01$). U kontrolních zvířat průměrná amplituda sEPSC klesla z $29,7 \pm 2,2$ pA na $25,9 \pm$

1,4 pA ($n=20$, $p < 0,05$) po aplikaci TTX. Kontrolní neurony inkubované v $\text{TNF}\alpha$ dosahovaly amplitudy sEPSC $22,6 \pm 1,9$ pA a po aplikaci TTX byla amplituda mEPSC $21,1 \pm 1,7$ pA ($n=9$). Spontánní ani miniaturní EPSC se nelišily v amplitudě při porovnání inkubovaných a neinkubovaných neuronů v $\text{TNF}\alpha$ a to jak v případě řezů po axotomii, tak v kontrolních řezech. Standardizované průměrné amplitudy sEPSC (100 %) byly vyšší než amplitudy mEPSC u obou skupin – axotomizovaných i kontrolních neuronů, s inkubací i bez inkubace v $\text{TNF}\alpha$ (Obrázek 20B). Žádný rozdíl v poklesu průměrné amplitudy sEPSC nebyl pozorován u axotomizovaných neuronů po podání TTX ve srovnání řezů inkubovaných v $\text{TNF}\alpha$ ($85,1 \pm 4,2$ %, $n=12$, $p<0,01$) a neinkubovaných ($86,2 \pm 2,6$ %, $n=18$, $p<0,001$, Obrázek 20B). U kontrolních řezů tetrodoxin indukoval pouze malou změnu amplitudy sEPSC, po inkubaci v $\text{TNF}\alpha$ ($94,7 \pm 4,2$ %, $n=9$) i ve skupině bez této inkubace ($91,1 \pm 3,3$ %, $n=20$, $p<0,05$).

Dále byla zkoumána modulace aktivity TRPV1 receptorů pomocí $\text{TNF}\alpha$ po podání endogenního agonisty OLDA, po přetěti sedacího nervu. Již dřívější experimenty naší laboratoře ukázaly, že nízké koncentrace OLDA ($0,2 \mu\text{M}$) nevyvolávají žádné změny ve frekvenci mEPSC u kontrolních řezů (Spicarova and Palecek 2009; Spicarova and Palecek 2010). Stejným výsledkem dopadly i experimenty zde ukázané: Aplikace $0,2 \mu\text{M}$ roztoku OLDA nezměnila frekvenci mEPSC na kontrolních neuronech ($94,8 \pm 5,0$ %, $n=6$). Naproti tomu u akutních míšních řezů po axotomii nízká koncentrace OLDA ($0,2 \mu\text{M}$) signifikantně zvýšila frekvenci miniaturních EPSC ($175,9 \pm 17,3$ %, $n=13$, $p<0,01$) při porovnání s frekvencí po aplikaci TTX (=100 %, Obrázek 21A). Závěrečná aplikace kapsaicinu ($0,2 \mu\text{M}$) v této skupině neuronů podstatně zvýšila snímanou frekvenci mEPSC ($699,2 \pm 426,9$ %). Podání OLDA výrazně zvýšilo také frekvenci u axotomizovaných neuronů po inkubaci v $\text{TNF}\alpha$ ($158,1 \pm 19,5$ %, $n=14$, $p<0,05$). Kapsaicin v tomto případě vyvolal nárůst frekvence mEPSC na $860,2 \pm 343,2$ %. Rozdíl ve zvýšení frekvenci vlivem OLDA v axotomizovaných neuronech inkubovaných v $\text{TNF}\alpha$ a bez inkubace nebyl statisticky významný. Z hlediska absolutní hodnoty frekvence mEPSC (Hz) dosáhly vyšších hladin snímání v axotomizovaných neuronech po inkubaci v $\text{TNF}\alpha$ (mEPSC: $2,17 \pm 0,63$ Hz; OLDA: $2,76 \pm 0,75$ Hz, $n = 14$) než axotomizované neurony bez inkubace (mEPSC: $0,97 \pm 0,22$ Hz; OLDA: $1,51 \pm 0,30$ Hz, $n = 13$, Obrázek 21B). Tento rozdíl však nebyl statisticky signifikantní.

Aplikace OLDA, u zvířat s axotomií, nezměnila amplitudu miniaturních EPSC a to v případě řezů inkubovaných v $\text{TNF}\alpha$ (mEPSC: $28,0 \pm 2,9$ pA; OLDA: $25,9 \pm 2,7$ pA,

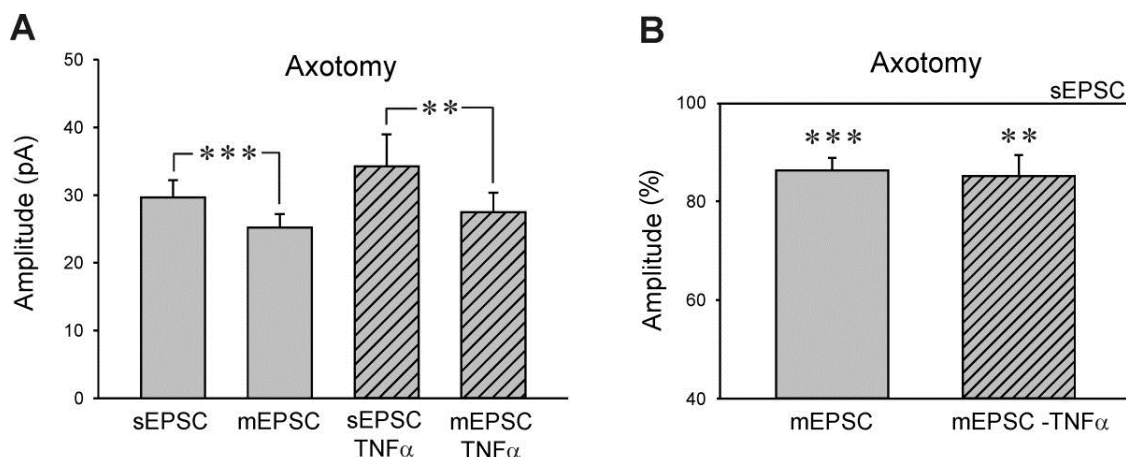
n=14) i bez této inkubace (mEPSC: $23,7 \pm 2,5$ pA; OLDA: $23,6 \pm 2,6$ pA, n = 13), podobně jako u kontrolních zvířat v předchozí studii naší laboratoře (Spicarova and Palecek 2009).



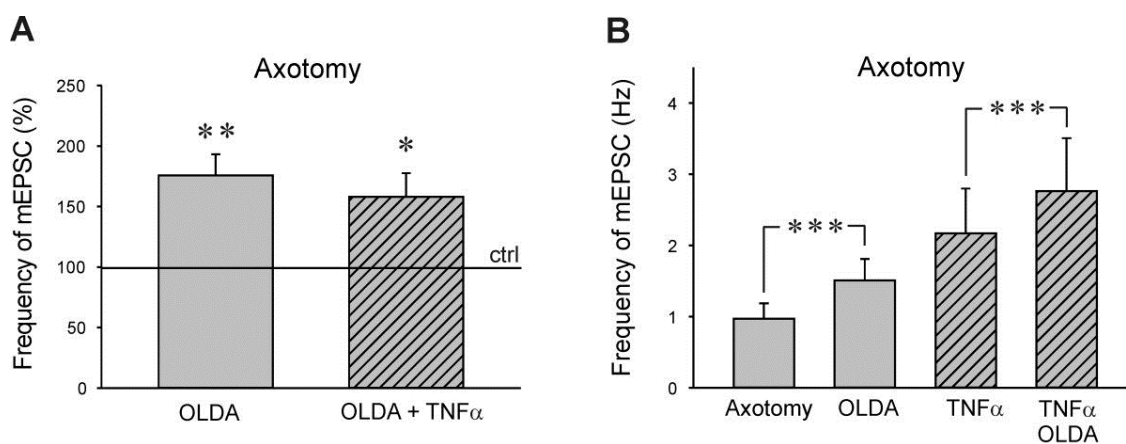
Obrázek 19 Vliv $TNF\alpha$ na frekvenci sEPSC a mEPSC v neuronech zadních rohů míšních.

Nativní záznam sEPSC a mEPSC v neuronech po axotomii (A) a u kontrolních zvířat (B), po inkubaci v $TNF\alpha$ a bez inkubace. (C) Inkubace v $TNF\alpha$ (60 nM) zvýšila frekvenci sEPSC na řezech po přetěti sedacího nervu (n=12, $##p<0,01$), ve srovnání s neinkubovanými řezy (n=18). Průměrná frekvence mEPSC po akutním podáním tetrodotoxinu (TTX; 0,5 μ M) v obou skupinách, s inkubací i bez inkubace v $TNF\alpha$, a výrazně snižovala frekvenci ve srovnání s frekvencí spontánních proudů ($***p<0,01$) (D). Průměrná frekvence sEPSC (n=9, $##p<0,01$) a mEPSC ($#p<0,05$) byla výrazně vyšší u kontrolních zvířat po inkubaci v $TNF\alpha$. Podání TTX významně snížilo frekvenci sEPSC v obou skupinách, s inkubací v $TNF\alpha$ ($*p<0,01$) i bez ní ($**p<0,01$). (E) Tetrodotoxin masivně snížil frekvenci sEPSC v míšních řezech po axotomii inkubovaných v $TNF\alpha$ (n=12). Tento

pokles frekvence sEPSC po aplikaci TTX indukovaný $TNF\alpha$ nebyl přítomen u kontrolních řezů (n=9). Tetrodotoxinem navozený pokles frekvence sEPSC v řezech po axotomii bez inkubace s $TNF\alpha$ (n=18) se statisticky nelišil od kontrolní skupiny (n=20). * = porovnání mEPSC a sEPSC; # = porovnání vlivu inkubace v $TNF\alpha$ na sEPSC a mEPSC.



Obrázek 20 Vliv $TNF\alpha$ na amplitudu sEPSC a mEPSC. (A) Průměrná amplituda sEPSC a mEPSC se nelišila v rámci skupiny po axotomii při porovnání vlivu inkubace $TNF\alpha$. Podání tetrodoxinu ($0,5 \mu M$) významně snížilo v obou případech frekvenci sEPSC (inkubace v $TNF\alpha$: $n=12$, $**p<0,01$; bez inkubace: $n=18$, $***p<0,001$). (B) Snížení amplitudy sEPSC po podání TTX bylo podobné po inkubaci v $TNF\alpha$ ($**p<0,01$) i bez ní ($***p<0,001$).



Obrázek 21 Vliv nízké koncentrace N-oleoyldopaminu na frekvenci sEPSC a mEPSC po axotomii. (A) Neurony z řezů po axotomii vykazovaly nárůst frekvence mEPSC po podání endogenního agonisty TRPV1 receptorů N-oleoyldopaminu (OLDA, $0,2 \mu M$; $n=13$; $**p<0,01$). Nárůst frekvence mEPSC indukovaný OLDA byl podobný po inkubaci v $TNF\alpha$ ($n=14$; $*p<0,05$). (B) Absolutní hodnota frekvence mEPSC snímaná v neuronech po inkubaci v $TNF\alpha$ byla vyšší než u neuronů bez inkubace. Tento rozdíl však nedosáhl hladiny statistické významnosti.

6 Diskuze

Na úrovni zadního rohu míšního dochází k prvotnímu synaptickému přenosu mezi primárními aferenty, nesoucími informace o podnětech v tkáních mimo CNS, a spinálními neurony. Superficiální oblast zadního rohu pak obsahuje neurony a synapse zprostředkovávající první nociceptivní transmissi před vstupem do vyšších nervových center utvářejících celkový vjem bolesti. Z tohoto důvodu je modulace těchto synapsí důležitým cílem pro možné terapeutické ovlivnění, zejména u patologických bolestivých stavů. V následujících kapitolách jsou diskutovány výsledky našich studií zaměřené na inhibici nociceptivní transmise pomocí 20:4-NAPE, zprostředkovanou CB1 a TRPV1 receptory za fyziologických a patologických podmínek. V poslední sekci je diskutován vliv cytokinu TNF α na modulaci nociceptivního synaptického přenosu v míše.

6.1 Produkce anandamidu v míšních řezech po aplikaci 20:4-NAPE

20:4-NAPE představuje jeden z hlavních prekursorů syntézy anandamidu, jak v enzymových preparátech, tak v kultuře primárních sensorických neuronů (Varga, Jenes et al. 2014). Naše výsledky ukazují, že anandamid je také produkovan akutními míšními řezy po aplikaci 20:4-NAPE, za podmínek podobných našim elektrofyziologickým experimentům. Následující pokusy v podobném uspořádání (data nezahrnuta v této dizertační práci), avšak s větším množstvím míšních řezů (18), naznačují, že množství AEA produkované míšními řezy je závislé na koncentraci dodaného prekursoru (Nerandzic, Mrozkova et al. 2017). Ačkoliv nelze zcela vyloučit přímé působení 20:4-NAPE, případně účinky jiných metabolitů na další receptory než samotného anandamidu, předpokládáme, že drtivá většina modulačních účinků pozorovaná v našich studiích byla zprostředkována syntézou AEA, následně působícího na CB1 a TRPV1 receptory. Produkce anandamidu pomocí 20:4-NAPE je možná několika způsoby. NAPE-PLD je závislé na přítomnosti Ca²⁺ a tento enzym se vyskytuje jak v primárních aferentech, tak dalších neuronech a gliích (Cristino, Starowicz et al. 2008; Nagy, Fedonidis et al. 2009; Hegyi, Hollo et al. 2012; Moreno-Martet, Mestre et al. 2012; Varga, Jenes et al. 2014). Druhou možností je na vápníku nezávislá cesta přes enzymy GDE1, ABDH4 a další, kterou navrhuje Varga a kol. (2014) jako preferenční způsob produkce AEA v primárních aferentech.

6.2 Vliv 20:4-NAPE na miniaturní excitační postsynaptické proudy v nociceptivní signalizaci

Důležitost TRPV1 a CB1 receptorů pro nociceptivní signalizaci a její modulaci na míšní úrovni byla ukázána již dříve (Fioravanti, De Felice et al. 2008; Starowicz, Makuch et al. 2012; Spicarova, Nerandzic et al. 2014). Naše výsledky naznačují, že 20:4-NAPE a následně AEA může ovlivňovat oba tyto receptory rozdílným způsobem, v závislosti na podmínkách – kontrolních či patologických.

V našich experimentech aplikace prekurzoru AEA, 20:4-NAPE, vyvolala masivní inhibici frekvence mEPSC v superficiálních neuronech zadních rohů míšních, jak na řezech z kontrolních zvířat, tak u zvířat s navozeným periferním zánětem. U kontrolních zvířat byla tato inhibice po podání 20:4-NAPE zprostředkována především CB1 receptory. Při zánětu však inhibičnímu působení 20:4-NAPE bylo možné předejít podáním antagonistů TRPV1 receptorů, což ukazuje na jejich možné zapojení do této modulační.

Aplikace antagonisty CB1 receptorů v neuronech z kontrolních řezů signifikantně zvýšila frekvenci mEPSC. Jeden z možných mechanismů útlumu nociceptivní signalizace představuje tonická aktivita CB1 receptorů skrze signální kaskádu vedoucí od trimerních $G_{i/o}$ proteinů. Tato kaskáda stimuluje draslíkové usměrňující kanály (Kir) a draslíkové kanály Kv1.4 (A-typu) a potlačuje aktivitu N- a P/Q typu Ca^{2+} kanálů (Pertwee 2006), což vede ke snížení výlevu glutamátu z presynaptických zakončení. Pozorovaný nárůst frekvence mEPSC v našich experimentech byl tak pravděpodobně zapříčiněn zablokováním tonické aktivity CB1 receptorů (Richardson, Aanonsen et al. 1998).

Během podání 20:4-NAPE za přítomnosti CB1 antagonisty nedošlo k signifikantní změně frekvence miniaturních excitačních postsynaptických proudů. Tyto výsledky naznačují, že CB1 receptory hrají důležitou roli v inhibici frekvence mEPSC vyvolanou aplikací 20:4-NAPE. Pravděpodobně klíčový prvek tvoří AEA, produkovaný z 20:4-NAPE několika možnými metabolickými drahami zahrnujícími enzymy GDE1, ABDH4, SHIP1, PTP, sPLA a NAPE-PLD (Okamoto, Morishita et al. 2004; Liu, Wang et al. 2008; Varga, Jenes et al. 2014). Přesto, s ohledem na přítomnost menšího poklesu frekvence mEPSC po ko-aplikaci 20:4-NAPE a CB1 antagonisty, nelze vyloučit i zapojení dalších mechanismů, nezávislých na aktivaci CB1 receptoru, snižujících výlev glutamátu ze zakončení.

Administrace antagonisty TRPV1 receptorů v pokusech na míšních řezech z kontrolních zvířat nezměnila základní frekvenci mEPSC, podobně jako v našich předchozích studiích (Spicarova and Palecek 2009; Spicarova, Adamek et al. 2014). Nelze však vyloučit, že za fyziologičtějších podmínek či *in vivo* mohou být TRPV1 receptory tonicky aktivní a ovlivňovat tak uvolňování glutamátu (Gavva, Bannon et al. 2007). Podání 20:4-NAPE za přítomnosti TRPV1 antagonisty vyvolalo podobnou míru inhibice jako v případě samotné aplikace 20:4-NAPE. To naznačuje, že na této inhibici se TRPV1 receptory nepodílejí. Pravděpodobně koncentrace AEA, po aplikaci 20:4-NAPE, nebyla dostatečná pro aktivaci TRPV1 receptorů. To mohlo být způsobeno relativně malou citlivostí TRPV1 receptorů vůči AEA za kontrolních podmínek (Zygmunt, Petersson et al. 1999).

Anandamid aktivuje presynaptické TRPV1 receptory, jak ukázala studie Jenningsa a kol. (2003). Naše experimenty se však liší ve způsobu podání tohoto agonisty TRPV1 receptorů. Používali jsme prekurzor AEA, 20:4-NAPE, čímž nedocházelo k zaplavení všech receptorů citlivých na AEA, ale lokální koncentrace AEA byla závislá na své produkci z 20:4-NAPE. I proto se mohly vyskytovat výrazné rozdíly v koncentračních gradientech na malých mikrodoménách uvnitř míšních řezů, v závislosti na přítomnosti a aktivitě enzymů konvertujících 20:4-NAPE na AEA. Jeden z nich, 20:4-NAPE-PLD, je exprimován na kapsaicin-pozitivních primárních senzorických neuronech (Nagy, Fedonidis et al. 2009) i superficiálních neuronech zadních rohů míšních (Cristino, Starowicz et al. 2008). Později byl tento enzym také nalezen v mikrogliích a astrocytech míchy (Hegyi, Hollo et al. 2012). Na primárních senzorických neuronech se vyskytují také další dráhy přeměňující 20:4-NAPE na AEA. Jsou nezávislé na přítomnosti Ca^{2+} , na rozdíl od NAPE-PLD, a výsledky studie Vargy a kol. (2014) naznačují, že tyto dráhy by mohly na primárních aferentech převažovat. Zdá se, že aktivace CB1 či TRPV1 receptorů pomocí AEA může záviset také na enzymech konvertujících 20:4-NAPE, jejichž aktivita může zvyšovat lokální koncentraci AEA. Předpokládáme, že v našich preparátech mohou hrát roli na Ca^{2+} závislé i nezávislé dráhy, které vedou k produkci anandamidu.

Snímání na řezech ze zvířat s periferním zánětem ukázalo nárůst frekvence mEPSC, podobně jako v našich předchozích experimentech (Spicarova and Palecek 2009), přestože tento rozdíl ve srovnání se snímáním ze zdravých zvířat nedosáhl hladiny statistické významnosti. Zvýšený výlev glutamátu z presynaptického zakončení za podmínek zánětu, pozorovaný v přítomnosti TTX, může také přispívat k modulaci synaptické transmise *in vivo*. Zatímco většina těchto mechanismů je komplexní

záležitostí, v našich experimentech jsme pozorovali snížení bazální aktivace CB1 receptorů během zánětu, ve srovnání s kontrolními podmínkami. Ztráta inhibiční aktivity CB1 receptorů během zánětu byla popsána již dříve (Kelly and Chapman 2003). Hydroláza mastných kyselin (FAAH) je jedním z klíčových enzymů, které odbourávají AEA, a jako taková je zapojena do modulace nociceptivní transmise na míšní úrovni. Již dříve bylo ukázáno, že dochází k výrazné up-regulaci FAAH na modelech neuropatické bolesti a zánětu (Okine, Norris et al. 2012; Guindon, Lai et al. 2013). Rychlejší degradace anandamidu za těchto podmínek může vést k oslabení role celého endokanabinoidního systému v patologických bolestivých stavech (Okine, Norris et al. 2012). To odpovídá i nižším hladinám AEA pozorovaným na modelu akutní pooperační bolesti (Alkaitis, Solorzano et al. 2010). Tyto změny se mohou podílet na námi pozorovaném snížení konstitutivní aktivity CB1 receptorů (Howlett, Reggio et al. 2011), přítomné v podmínkách periferního zánětu.

Aplikace 20:4-NAPE (20 μ M) i po navození zánětu vyvolala výrazné snížení frekvence mEPSC. Zde však, oproti kontrolní situaci, frekvence mEPSC nebyla blokována CB1 antagonistou, ale podáním antagonisty TRPV1 receptorů. Tyto výsledky naznačují, že inhibiční účinek 20:4-NAPE, potažmo produkovaného AEA, na uvolňování glutamátu z presynaptického zakončení, je zprostředkován převážně TRPV1 receptory. Dřívější práce ukázaly zvýšenou citlivost TRPV1 receptorů vůči endogenním agonistům na modelu periferního zánětu (Spicarova and Palecek 2009), včetně zvýšené afinity vůči AEA díky fosforylaci (Singh Tahim, Santha et al. 2005). Anandamid otevírá TRPV1 receptory a způsobuje tak vtok Ca^{2+} do neuronu. Zvýšení koncentrace vápníku může aktivovat na Ca^{2+} závislou fosfatázu kalcineurin či kinázu kalmodulin (Lishko, Procko et al. 2007). Aktivace kalmodulinu může vést k akutní desenzitizaci TRPV1 receptorů (Koplas, Rosenberg et al. 1997). Kalcineurin ve srovnání s kinázami závislými na vápníku je účinnější při nižších koncentracích Ca^{2+} (Jung, Shin et al. 2004). Tato fosfatáza je široce exprimována v DRG neuronech a nachází se v blízkosti plazmatické membrány (Lukyanetz 1997), kde podléhá tonické aktivaci (Wu, Chen et al. 2005). Kalcineurin defosforyluje proteiny, které se podílejí na uvolňování neurotransmiterů a reguluje tak výlev glutamátu (Nichols, Suplick et al. 1994; Sihra, Nairn et al. 1995). Navíc, útlum synaptické transmise zprostředkovaný presynaptickým kalcineurem, aktivovaným TRPV1 receptory, byl již ukázán v hipokampu (Jensen and Edwards 2012) a také dlouhodobé blokování kalcineurinu vede k hypersenzitivitě a posílení postsynaptických NMDA proudů (Chen, Hu et al. 2014). Na rozdíl od dobře

zdokumentované indukce výlevu glutamátu po aktivaci TRPV1 receptorů (Spicarova, Adamek et al. 2014) se zdá pravděpodobné, že v našich experimentech za zánětlivých podmínek AEA produkovaný z 20:4-NAPE endogenními enzymy otevíral TRPV1 receptory a následně byl preferenčně aktivován kalcineurin. Ten pak zprostředkoval neočekávaný pokles mEPSC v superficiálních neuronech zadního rohu míšního.

Rovnováha mezi fosfatázami a kinázami aktivovanými vtokem vápníku skrz otevřené TRPV1 receptory může být klíčová pro pozorované snížení frekvence mEPSC po aplikaci 20:4-NAPE a nárůstu frekvence na konci experimentu po podání kapsaicinu, v souladu s předchozími studiemi (Spicarova and Palecek 2009; Spicarova, Nerandzic et al. 2011; Kim, Back et al. 2012; Spicarova, Adamek et al. 2014). Zatímco administrace 20:4-NAPE mohla vést k aktivaci pouze TRPV1 receptorů nacházejících se v blízkosti enzymu produkujících AEA, aplikace kapsaicinu mohla aktivovat veškeré TRPV1 receptory přímo. Tzv. „cross-talk“ mezi TRPV1 a CB1 receptory ukázalo již několik prací (Maione, Bisogno et al. 2006; Horvath, Kekesi et al. 2008; Di Marzo and De Petrocellis 2012; Starowicz, Makuch et al. 2012). Přesné mechanismy však ještě nejsou identifikovány, stejně jako námi pozorované přepnutí mezi CB1 a TRPV1 receptory při zprostředkování poklesu frekvence mEPSC vyvolané 20:4-NAPE. Je nutné poznamenat, že jsme neměřili aktivitu jednotlivých receptorů, ale změny excitačních postsynaptických proudů za přítomnosti TTX, bikukulinu a strychninu v zadních rožích míšních při aplikaci různých látek.

Naše studie neukázaly silné zapojení CB1 receptorů do inhibičního působení 20:4-NAPE na mEPSC za podmínek zánětu. Úloha CB1 receptorů v nociceptivním přenosu se v různých studiích liší. Některé ukazují „kanonické“ antinociceptivní působení CB1 receptoru, které je zesíleno při navození zánětu (Martin, Loo et al. 1999; Amaya, Shimosato et al. 2006), zatímco další ukazují útlum antinocicepce zprostředkované CB1 receptory (Kelly and Chapman 2003). Některé pozdější publikace také naznačují možnost pronociceptivního působení CB1 receptorů (Fioravanti, De Felice et al. 2008; Pernia-Andrade, Kato et al. 2009; Zhang, Chen et al. 2010). Shodně popisují ovlivnění inhibičních interneuronů ve svrchních vrstvách zadního rohu míšního. Zde aktivace CB1 receptorů oslabovala výlev GABA a glycinu (Pernia-Andrade, Kato et al. 2009; Zhang, Chen et al. 2010) a opioidů (Zhang, Chen et al. 2010). Fioravanti a kol. (2008) také popsali senzitivizaci TRPV1 receptorů na senzorických neuronech, skrze aktivaci CB1

receptorů. Toto pronociceptivní působení CB1 receptorů pravděpodobně neovlivnilo naše výsledky, neboť GABA a glycinové receptory byly zablokovány po celou dobu snímání.

Během periferního zánětu dochází k posílení role glií v modulaci nociceptivní transmise (Fernandez-Ruiz, Romero et al. 2007). CB1 receptory byly lokalizovány i na astrocytech (Salio, Doly et al. 2002; Alkaitis, Solorzano et al. 2010), kde aktivují ERK-MAPK a PKB dráhu ovlivňující přežívání buněk (Gomez Del Pulgar, De Ceballos et al. 2002). Kanabinoidní receptory se na astrocytech také podílejí na oxidaci glukózy, ketogenezi a hydrolýze sfingomyelinu (Stella 2004). Pravděpodobně žádná z těchto signálních kaskád zprostředkovaná CB1 receptory neměla přímý vliv na inhibiční účinek 20:4-NAPE v naší studii.

Nelze vyloučit podíl gliálních CB2 receptorů, díky jejich afinitě vůči AEA. Kanabinoidní receptory 2 jsou exprimovány především mikroglie, ale lze je nalézt také na astrocytech (Fernandez-Ruiz, Romero et al. 2007). Tyto receptory tlumí tvorbu prozánětlivých molekul, jako je TNF α , IL-1 a IL-6 (Ehrhart, Obregon et al. 2005; Fernandez-Ruiz, Romero et al. 2007). TNF α se může podílet na senzitivaci TRPV1 receptorů a zvyšovat frekvenci EPSC během periferního zánětu (Xu, Zhang et al. 2010; Spicarova, Nerandzic et al. 2011) a jeho down-regulace aktivací CB2 receptorů nemůže být v naší studii zcela vyloučena.

Anandamid byl v našich experimentech produkován pouze lokálně, na základě exprese enzymů konvertujících 20:4-NAPE. Rozdílné místní koncentrace AEA tak mohly ovlivňovat odlišné receptory. Naše výsledky naznačují význam prekursoru anandamidu, 20:4-NAPE, a/nebo enzymů, které jej přeměňují na AEA. Změny v aktivaci TRPV1 a CB1 receptorů endogenními ligandy, k nimž dochází po navození periferního zánětu, se mohou významně podílet na rozvoji patologických bolestivých stavů. Komplexita signalizace CB1 a TRPV1 receptorů na místní úrovni zaslouží další výzkum. Naše výsledky však naznačují, že dochází k přepnutí či změně převládající aktivace CB1 či TRPV1 receptorů mezi normálními a zánětlivými podmínkami, a přinášejí tak další důkaz o významu těchto receptorů v modulaci bolesti.

6.3 Vliv 20:4-NAPE na spontánní excitační postsynaptické proudy v nociceptivní signalizaci

6.3.1 Aktivace CB1 a TRPV1 receptorů anandamidem

CB1 a TRPV1 receptory představují hlavní cíl anandamidu (Devane, Hanus et al. 1992; Zygmunt, Petersson et al. 1999) a naše data ukazují, že oba tyto receptory zprostředkovávají větší část inhibičního působení 20:4-NAPE. Přesto, díky vysoké promiskuitě anandamidu, nelze vyloučit zapojení ani dalších molekul, včetně receptoru aktivované proliferátory peroxisomů alfa a gama, sodné a vápníkové kanály T-typu (Chemin, Monteil et al. 2001; Kim, Kim et al. 2005; O'Sullivan 2007; Okura, Horishita et al. 2014). Nicméně s ohledem na masivní účinek antagonistů CB1 a TRPV1 receptorů je následující diskuse zaměřena právě na tyto dva receptory.

Inhibiční vliv na frekvenci sEPSC navozený aplikací 20:4-NAPE byl v kontrolních podmínkách zprostředkován především aktivací CB1 receptorů, podobně jako v případě mEPSC. Ačkoliv byla zdokumentována exprese CB1 receptorů i postsynapticky (Farquhar-Smith, Egertova et al. 2000), většina studií navrhuje výlučně presynaptickou lokalizaci těchto receptorů: Na míšních terminálech DRG neuronů a terminálech inhibičních GABAergních interneuronů (Nyilas, Gregg et al. 2009; Pernia-Andrade, Kato et al. 2009; Hegyi, Hollo et al. 2012; Veress, Meszar et al. 2013). Na obou místech vede aktivace CB1 receptorů ke snížení výlevu neurotransmiteru (Morisset and Urban 2001; Nyilas, Gregg et al. 2009; Pernia-Andrade, Kato et al. 2009). V našich experimentech byl inhibiční synaptický přenos farmakologicky zablokován. Je tedy možné předpokládat, že námi pozorovaný inhibiční účinek 20:4-NAPE zprostředkovaný CB1 receptory nastal díky aktivaci CB1 receptorů pomocí AEA a následnému potlačení uvolňování transmiteru z míšních zakončení DRG neuronů.

Antagonista CB1 receptorů za kontrolních podmínek sám o sobě mírně zvyšoval frekvenci sEPSC, i když tento nárůst nedosáhl hladiny statistické významnosti. V souladu s našimi dřívějšími experimenty, antagonist TRPV1 receptorů neovlivňoval frekvenci sEPSC v superficiálních neuronech zadního rohu míšního (Spicarova, Adamek et al. 2014). Přesto, slabší tonická aktivita TRPV1 receptorech, podílející se na sEPSC, byla dříve pozorována v neuronech z laminy II u myší (Park, Lu et al. 2011).

Mohutný pokles frekvence sEPSC zprostředkované AMPA receptory (Spicarova and Palecek 2010), vyvolaný podáním 20:4-NAPE, byl také doprovázen u některých neuronů

mírným poklesem amplitudy sEPSC. V našich preparátech měly snímané neurony mnohočetné kontakty s velkým počtem synapsí, které spontánně uvolňovaly glutamát a indukovaly tak sEPSC. Masivní snížení frekvence mohlo také přispět k silnému útlumu výlevu glutamátu ze specifických zakončení, které reagovaly na aplikaci 20:4-NAPE, což vedlo k poklesu průměrné sEPSC amplitudy bez ovlivnění postsynaptických mechanismů.

6.3.2 Vliv periferního zánětu

Prekursor anandamidu, 20:4-NAPE, na míšních řezech po navození periferního zánětu vyvolal signifikantní inhibici frekvence sEPSC, podobně jako u neuronů z kontrolních zvířat. Avšak SB366791 snížil frekvenci sEPSC, což naznačuje tonickou aktivitu presynaptických TRPV1 receptorů. Pozorovaný účinek SB36691 *per se* je v souladu s indukcí tonické aktivity po zánětu (Lappin, Randall et al. 2006) a zvýšené citlivosti vůči endogenním agonistům (Spicarova and Palecek 2009) u presynaptických TRPV1 receptorů v zadním rohu míšním. Drtivá většina těchto receptorů je exprimována na míšních zakončeních C-vláken, lokalizovaných v superficiální části zadního rohu míšního (Caterina, Schumacher et al. 1997; Guo, Vulchanova et al. 1999). Díky této vysoké míře exprese TRPV1 receptorů má jejich regulace (aktivace, desenzitizace a inhibice) velký vliv na uvolňování glutamátu z těchto zakončení (Spicarova, Nerandzic et al. 2014). Modulace TRPV1 receptorů tak může být základem některých patologických bolestivých stavů (Kanai, Nakazato et al. 2005; Spicarova, Nerandzic et al. 2011; Spicarova, Adamek et al. 2014).

Po navození zánětu nebyla zjištěna tonická aktivace CB1 receptorů. Nicméně antagonist CB1 receptorů zabránil inhibičnímu působení 20:4-NAPE na frekvenci sEPSC. Navíc, po podání 20:4-NAPE při současném blokování CB1 receptorů došlo k signifikantnímu nárůstu frekvence sEPSC. Tomuto potenciálnímu účinku zabránila inhibice TRPV1 receptorů (Obrázek 18F). Tyto výsledky naznačují, že za podmínek zánětu bylo snížení frekvence sEPSC navozené aplikací 20:4-NAPE zprostředkováno CB1 receptory, zatímco možné zapojení TRPV1 receptorů bylo odhaleno pouze během zablokování CB1 receptorů.

Podobně jako v případě ovlivnění frekvence sEPSC a mEPSC, aplikace 20:4-NAPE snižuje amplitudu evokovaných EPSC v zadních rozích míšních, za kontrolních podmínek i po navození periferního zánětu (data nejsou zahrnuta v této dizertační práci);

(Nerandzic, Mrozkova et al. 2017). Na neuronech z míšních řezů ze zdravých zvířat bylo možné zablokovat pokles amplitudy eEPSC podáním antagonisty CB1 receptorů. Oproti tomu na modelu zánětu pokusy s evokovanými EPSC ukázaly zapojení jak CB1, tak TRPV1 receptorů v inhibičním působení 20:4-NAPE. To naznačuje zvýšenou citlivost TRPV1 receptorů a jejich aktivace mohla vést k rychlé internalizaci napěťově závislých Ca^{2+} kanálů skrze působení kalcineurinu (diskutované v sekci „Vliv 20:4-NAPE na miniaturní excitační postsynaptické proudy v nociceptivní signalizaci“), což vedlo ke snížení synchronizovaného výlevu neuropřenašeče (Wu, Chen et al. 2005).

Celkově naše data ukazují, že inhibiční vliv 20:4-NAPE je pravděpodobně zprostředkován indukcí syntézy anandamidu, který dále aktivuje své TRPV1 a CB1 receptory. U anandamidu, díky jeho lipofilní povaze, lze očekávat jeho tvorbu poblíž místa zamýšleného účinku. Primární senzory expremující TRPV1 receptory také produkují řadu enzymů syntetizujících AEA (Sousa-Valente, Varga et al. 2014; Varga, Jenes et al. 2014; Sousa-Valente, Varga et al. 2017). Dále byly nalezeny transkripty AEA syntetizujících enzymů i v zadním rohu míšním (Malek, Kucharczyk et al. 2014). Zesílení aktivity během zánětu či elektrické stimulace primárních aferentních vláken vedlo k nárůstu koncentrace Ca^{2+} v presynaptickém zakončení. To mohlo vyvolat či zvýšit enzymatickou aktivitu na vápníku závislého NAPE-PLD. Také vtok Ca^{2+} skrz postsynaptické AMPA receptory mohl vést k tvorbě anandamidu z 20:4-NAPE, jelikož NAPE-PLD je také expremováno v postsynaptických dendritech zadních rohů míšních (Hegyi, Hollo et al. 2012). Na vápníku nezávislé enzymatické dráhy i aktivita NAPE-PLD jako součást retrográdních inhibičních mechanismů (Katona and Freund 2008) mohou být také zapojeny do pozorované syntézy AEA. Během zánětu NAPE-PLD a další enzymy produkující anandamid mohou představovat klíčovou součást regulace nociceptivní signalizace na míšní úrovni.

Právě metoda lokální produkce anandamidu z jeho prekursoru, tzv. na vyžádání, může být výhodná i v klinickém nastavení léčby bolesti. Klinický vývoj v posledních letech se zaměřoval na zvýšení hladiny anandamidu pomocí inhibice FAAH (Mallet, Dubray et al. 2016). Preklinické programy řady specifických inhibitorů FAAH byly úspěšné při potlačování symptomů souvisejících s neuropatickou (např. URB-597 vyvinutý v Kadmus Pharmaceuticals; JNJ-42165279 firmy Janssen ad.) či zánětlivou bolestí (PF-04457845, Pfizer); (Ahn, Smith et al. 2011; Kwilas, Abdullah et al. 2014; Keith, Jones et al. 2015). Navíc první podání lidem prokázalo bezpečnost těchto nových molekul,

stejně jako slibné farmakodynamické výsledky v podobě nárůstu hladin AEA a dalších sledovaných faktorů (Li, Winter et al. 2012; Mallet, Dubray et al. 2016). Avšak první podání pacientům v cílových populacích bylo neúčinné a další vývoj byl v řadě případů zastaven (Huggins, Smart et al. 2012; Mallet, Dubray et al. 2016), některé se však znovu nedávno vrátily do preklinického vývoje s novou potenciální indikací (Griebel, Stemmelin et al. 2018).

Blokování degradace anandamidu, přes terapeutický potenciál, může mít zejména v léčbě bolesti i dopad v podobě „zaplavení“ celé tkáně vyšším množstvím AEA. Tím může dojít i k aktivaci jiných než pouze cílových receptorů (např. CB1), ale dalších receptorů, působících opačně (např. TRPV1 receptor). Terapeutický efekt může být díky tomu do značné míry negován, zejména v případě irreverzibilních inhibitorů FAAH, mezi které patří JNJ-42165279, PF-04457845, jak ukázala již studie Hugginse a kol. (2012). Další vývoj podobných inhibitorů také výrazně ovlivnila studie s BIA 10-2474 v r. 2016, která díky dosud ne zcela objasněným pochybením, pravděpodobně zejména v preklinické fázi vývoje a ne zcela standardních postupů při prvním opakovaném podání zdravým dobrovolníkům, vyústila v jedno úmrtí a několik závažných nežádoucích příhod (Chaikin 2017). Tento případ také vyústil v zásadní revizi evropských předpisů pro první podání nových léčiv lidem, které vstoupily v platnost od 1. února 2018 (CHMP 2018).

Oproti tomu syntéza AEA na vyžádání, ukázaná v našich experimentech, může mít kapacitu udržovat hladiny na přiměřené terapeutické úrovni díky zachované aktivitě degradačního enzymu FAAH, tedy ustanovené dynamické rovnováze. Tento směr výzkumu samozřejmě vyžaduje řadu dalších studií, které podpoří či vyloučí terapeutický potenciál tohoto přístupu.

6.4 Vliv TNF α na nociceptivní synaptický přenos v míše v modelu neuropatické bolesti

Při poranění periferních nervů má cytokin TNF α významný vliv na zprostředkování nociceptivní informace na míšní úrovni. V našich experimentech jsme testovali možné zapojení TNF α do modulace synaptického přenosu v superficiálních neuronech zadního rohu míšního na modelu periferní neuropatie. Dosažené výsledky ukazují nárůst regulačního působení TNF α na TTX-senzitivní sodné kanály, po pěti dnech od provedení axotomie sedacího nervu. Toto nervové poranění také zvýšilo citlivost presynaptických TRPV1 receptorů vůči endogennímu agonistovi OLDA. Funkční změny

na presynaptických zakončeních primárních aferentů byly pravděpodobně také spojeny s nocicepcí *in vivo*, neboť snímané neurony se nacházely v superficiálních laminách zadního rohu míšního a většina reagovala na kapsaicin.

TNF α indukovalo masivní zvýšení frekvence sEPSC v neuronech po přetěti sedacího nervu, zatímco u kontrolních zvířat účinek inkubace s TNF α byl pouze mírný. Pravděpodobně byl tento nárůst u řezů ze zvířat po axotomii zprostředkován zvýšením exprese TNFR1 receptorů a aktivací TTX-S Na $_v$ kanálů, vzhledem k tomu, že aplikace tetrodotoxinu snížila frekvenci sEPSC na 37 % původní úrovně. Cytokiny mají výrazný vliv na aktivitu sodných kanálů *in vitro* i v různých modelech neuropatické bolesti. V kultuře DRG neuronů TNF α zesiluje proudy skrz TTX-rezistentní sodné kanály aktivací TNFR1 receptoru a p38 MAPK (Jin and Gereau 2006). Neuropatie navozená přetětim ventrálních kořenů na úrovni pátého lumbálního obratle (L5 – VRT), která je doprovázena mechanickou alldynií a tepelnou hyperalgesií, zvyšuje imunoreaktivitu na TNF α a jeho receptor TNFR1 ipsilaterálně v neuronech DRG a oboustranně v zadních rozech míchy (Xu, Xin et al. 2006). Zablokování syntézy TNF α v tomto modelu neuropatie zabránilo aktivaci p38 MAPK v neuronech DRG a míšních mikroglií. Aktivace p38 MAPK je nezbytná pro vyvolání a udržování neuropatické bolesti (Xu, Xin et al. 2007). Model L5-VRT také zvyšuje mRNA pro Na $_v$ 1.3 a Na $_v$ 1.8, množství příslušných proteinů a aktuální hustotu TTX-S a TTX-R sodných kanálů v DRG neuronech (He, Zang et al. 2010). Zajímavé je, že upregulace obou sodných kanálů Na $_v$ 1.3 a Na $_v$ 1.8 byla zprostředkována cytokinem TNF α , což bylo ukázáno zablokováním jeho syntézy (Xu, Xin et al. 2006; He, Zang et al. 2010). Na myších s knockout TNFR1 (-/-) nedošlo k nárůstu sodíkových proudů v DRG neuronech po navození L5-VRT neuropatie (Chen, Pang et al. 2011). Naše výsledky na modelu periferní axotomie naznačují zvýšení výlevu glutamátu z presynaptických zakončení primárních aferentů v míše díky aktivitě TTX-senzitivních Na $_v$ kanálů. Těla neuronů dorzálních ganglií již nebyla přítomna během inkubace míšních řezů s TNF α . Proto je pravděpodobné, že nárůst spontánní aktivity byl způsoben modulací funkce TTX-senzitivních Na $_v$ kanálů: Fosforylací/defosforylací (Scheuer 2011), přesunem těchto kanálů z cytoplasmy na presynaptickou membránu (Shao, Okuse et al. 2009), popřípadě také jejich lokální syntézou v presynaptickém zakončení. Fosforylace TTX-S Na $_v$ 1.7 kanálu pomocí ERK1/2 MAP kinázy ovlivňuje vlastnosti napěťového zavírání tohoto kanálu a klidový membránový potenciál DRG neuronů (Stambouliau, Choi et al. 2010). Jiný sodný kanál, Na $_v$ 1.3, je po provedení axotomie upregulován, a dochází k jeho rychlé aktivaci

a inaktivaci (Waxman, Kocsis et al. 1994; Cummins and Waxman 1997). Právě zrychlené převedení Na_v 1.3 kanálu, exprimovaného podél axonu po axotomii, z inaktivního do aktivního stavu může přispívat ke zvýšené excitabilitě DRG neuronů v neuropatických podmínkách, zejména ve srovnání s přítomností Na_v 1.7 kanálů u DRG neuronů malého průměru za kontrolních podmínek (Cummins, Sheets et al. 2007). Presynaptické Na_v kanály modulují presynaptický akční potenciál, následný vstup Ca^{2+} a tím pádem i uvolnění neurotransmiteru ze zakončení. Zvýšení exprese TTX-S kanálů na presynaptických zakončeních tak může vést k zesílení presynaptického potenciálu a nárůst vstupu vápníku a výlevu glutamátu (Engel and Jonas 2005). Prezentované výsledky podporují hypotézu, že presynaptické sodné TTX-S Na_v kanály v míšních zakončeních primárních aferentů mohou zprostředkovávat zvýšený výlev neurotransmiteru a podílet se tak na hypersenzitivitě vyvolané neuropatickou bolestí.

V našich pokusech došlo pouze k malému ovlivnění amplitudy sEPSC podáním tetrodoxinu, bez ohledu na inkubaci s $\text{TNF}\alpha$ (kontrolní řezy ~93 %, řezy po axotomii ~86 %). To by naznačovalo, že před podáním TTX byla pouze velmi malá část sEPSC přítomna díky šíření akčního potenciálu v superficiálních neuronech DH v připravených míšních řezech; na rozdíl od neporušených nervových okruhů, jaké je možné zachovat při přípravě hipokampálních řezů (Hsia, Malenka et al. 1998). Použití $\text{TNF}\alpha$ nevyvolalo žádné výrazné změny v průměrné amplitudě sEPSC či mEPSC u snímaných neuronů, podobně jako u experimentů na kontrolních zvířatech (Spicarova and Palecek 2010) a v souladu s dalšími výsledky (Kawasaki, Zhang et al. 2008; Youn, Wang et al. 2008; Zhang, Berta et al. 2011). Nicméně na hipokampálních neuronech byla ukázáno, že $\text{TNF}\alpha$ zesiluje AMPA postsynaptické proudy zvýšením počtu AMPA receptorů vystavených na povrchu neuronů (Beattie, Stellwagen et al. 2002). Taktéž v míše byl transport AMPA receptorů díky $\text{TNF}\alpha$ demonstrován v souvislosti s periferním zánětem (Choi, Svensson et al. 2010) a buněčnou smrtí po poranění míchy (Ferguson, Christensen et al. 2008). Zesílení AMPA proudů pomocí $\text{TNF}\alpha$ bylo popsáno na neuronech zadních rohů míšních za kontrolních podmínek (Kawasaki, Zhang et al. 2008), zatímco další dvě studie nenalezly žádnou modulaci AMPA indukovaných proudů způsobenou $\text{TNF}\alpha$ v neuronech zadních rohů míšních (Youn, Wang et al. 2008; Zhang, Berta et al. 2011).

Předchozí studie naší laboratoře na DH neuronech za stejných podmínek ukázaly, že aplikace 10 μM roztoku OLDA je nezbytná pro zvýšení frekvence mEPSC, díky specifické aktivaci TRPV1 receptorů. Nižší koncentrace tohoto agonisty TRPV1

receptorů však neměla žádný účinek (Spicarova and Palecek 2009). Koncentrace OLDA potřebná k otevření presynaptických TRPV1 receptorů se dramaticky snížila na 0,2 μ M po aktivaci PKC forbolesterem a po navození periferního zánětu (Spicarova and Palecek 2009). Výsledky předkládané v této dizertační práci ukazují zvýšenou citlivost presynaptických TRPV1 receptorů vůči endogennímu agonistovi OLDA po přetěti sedacího nervu. Tato reaktivita vůči roztoku s nízkou koncentrací (0,2 μ M) OLDA může být zprostředkována fosforylací či upregulací presynaptických TRPV1 receptorů (Zhang, Huang et al. 2005). Jedním z mechanismů přispívajících k větší citlivosti TRPV1 receptorů může být nárůst exprese TNFR1 receptorů v DRG neuronech po poškození nervových vláken (Ohtori, Takahashi et al. 2004). V našich experimentech na neuronech po axotomii bylo zvýšení frekvence mEPSC po podání OLDA srovnatelné jak po inkubaci v roztoku TNF α , tak bez ní. Tento výsledek je v rozporu s předchozími experimenty na kontrolních řezech, kde naopak TNF α indukovalo odpověď na nízkou koncentrací (0,2 μ M) OLDA, která jinak v kontrolních podmínkách nebyla přítomna (Spicarova and Palecek 2010). Malý či respektive žádný vliv inkubace v TNF α na působení OLDA v řezech po axotomii může být způsoben již dříve senzitivizovanými TRPV1 receptory na presynaptických zakončeních. Další možnost představuje také snížení exprese TRPV1 receptorů pozorované po axotomii (Staaf, Oerther et al. 2009).

7 Závěr

Nociceptivní signalizace může být zásadním způsobem ovlivněna modulací synaptického přenosu v superficiální oblasti zadního rohu míšního. Naše výsledky potvrdily klíčovou úlohu TRPV1 a CB1 receptorů v přenosu nociceptivního signálu na míšní úrovni a naznačily možné změny za patologických bolestivých stavů, kdy se na modulaci přenosu významně podílí i prozánětlivý cytokin TNF α .

Presynapticky uložené CB1 receptory byly aktivovány podáním 20:4-NAPE při pokusech na kontrolních zvířatech, zatímco vliv TRPV1 receptorů se projevil po navození periferního zánětu. Za předpokladu, že je účinek 20:4-NAPE způsoben syntézou anandamidu, pak vyváženost signalizace anandamidu na jeho cílové receptory negativně ovlivňuje šíření nociceptivního signálu do supraspinálních oblastí CNS. Tato rovnováha může být narušena během zánětu.

Možnost lokální syntézy anandamidu tzv. na vyžádání po podání prekursoru, představuje jeden z možných směrů dalšího klinického vývoje léčby bolesti. Zejména v situaci, kdy klinické studie zaměřené na zvýšení hladiny anandamidu potlačením jeho hydrolýzy pomocí inhibitorů hydrolázy mastných kyseliny neukázaly klinickou účinnost.

Experimenty provedené na modelu přetětí sedacího nervu ukázaly důležitou regulační úlohu prozánětlivého cytokinu TNF α ve zpracování nociceptivních podnětů na míšní úrovni, kdy ovlivňuje aktivitu tetrodoxin-senzitivních sodíkových kanálů, zvýšený výlev glutamátu a zvýšenou citlivost TRPV1 receptorů vůči endogenním agonistům (data a diskuze ukazující vliv TNF α na citlivost TRPV1 receptorů jsou součástí dizertační práce). Všechny tyto mechanismy mohou významně ovlivňovat synaptický přenos v zadních rožích míšních a přispívat tak k rozvoji či udržování neuropatické bolesti.

Hlubší pochopení možností modulace nociceptivního synaptického přenosu na míšní úrovni, včetně poznání komplexnosti vztahů TRPV1 receptorů s CB1 receptory a cytokinem TNF α , tvoří nezbytný základ pro vývoj cílených analgetik i dalších terapeutických metod léčby bolesti.

8 Použitá literatura

- Agarwal, N., P. Pacher, et al. (2007). "Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors." Nat Neurosci **10**(7): 870-879.
- Ahluwalia, J., L. Urban, et al. (2002). "Cannabinoid 1 receptors are expressed by nerve growth factor- and glial cell-derived neurotrophic factor-responsive primary sensory neurones." Neuroscience **110**(4): 747-753.
- Ahluwalia, J., L. Urban, et al. (2000). "Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons." Neuroscience **100**(4): 685-688.
- Ahluwalia, J., M. Yaqoob, et al. (2003). "Activation of capsaicin-sensitive primary sensory neurones induces anandamide production and release." J Neurochem **84**(3): 585-591.
- Ahmad, A. H. and C. B. Abdul Aziz (2014). "The brain in pain." Malays J Med Sci **21**(Spec Issue): 46-54.
- Ahn, K., S. E. Smith, et al. (2011). "Mechanistic and pharmacological characterization of PF-04457845: a highly potent and selective fatty acid amide hydrolase inhibitor that reduces inflammatory and noninflammatory pain." J Pharmacol Exp Ther **338**(1): 114-124.
- Akopian, A. N., N. B. Ruparel, et al. (2009). "Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia." Trends Pharmacol Sci **30**(2): 79-84.
- Alkaitis, M. S., C. Solorzano, et al. (2010). "Evidence for a role of endocannabinoids, astrocytes and p38 phosphorylation in the resolution of postoperative pain." PLoS One **5**(5): e10891.
- Amantini, C., M. Mosca, et al. (2007). "Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is mediated by TRPV1 vanilloid receptor and requires p38 MAPK activation." J Neurochem **102**(3): 977-990.
- Amaya, F., G. Shimosato, et al. (2006). "Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates antihyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist." Pain **124**(1-2): 175-183.
- Astorga, G. B., J. (2008). "TRP channels as Biological Sensors." Physiological Mini-Reviews **3**(4): 25-33.
- Battaglia, G. and A. Rustioni (1988). "Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey." J Comp Neurol **277**(2): 302-312.
- Beattie, E. C., D. Stellwagen, et al. (2002). "Control of synaptic strength by glial TNF α ." Science **295**(5563): 2282-2285.
- Bicher, H. I. and R. Mechoulam (1968). "Pharmacological effects of two active constituents of marijuana." Arch Int Pharmacodyn Ther **172**(1): 24-31.
- Binzen, U., W. Greffrath, et al. (2006). "Co-expression of the voltage-gated potassium channel Kv1.4 with transient receptor potential channels (TRPV1 and TRPV2) and the cannabinoid receptor CB1 in rat dorsal root ganglion neurons." Neuroscience **142**(2): 527-539.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-39.
- Bonhaus, D. W., L. K. Chang, et al. (1998). "Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses." J Pharmacol Exp Ther **287**(3): 884-888.

- Borrito-Escuela, D. O., W. Romero-Fernandez, et al. (2013). "On the g-protein-coupled receptor heteromers and their allosteric receptor-receptor interactions in the central nervous system: focus on their role in pain modulation." Evid Based Complement Alternat Med **2013**: 563716.
- Bouaboula, M., C. Poinot-Chazel, et al. (1995). "Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1." Biochem J **312 (Pt 2)**: 637-641.
- Bramblett, R. D., A. M. Panu, et al. (1995). "Construction of a 3D model of the cannabinoid CB1 receptor: determination of helix ends and helix orientation." Life Sci **56**(23-24): 1971-1982.
- Breivogel, C. S., J. M. Lambert, et al. (2008). "Sensitivity to delta9-tetrahydrocannabinol is selectively enhanced in beta-arrestin2 *-/-* mice." Behav Pharmacol **19**(4): 298-307.
- Bridges, D., K. Ahmad, et al. (2001). "The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain." Br J Pharmacol **133**(4): 586-594.
- Bridges, D., S. W. Thompson, et al. (2001). "Mechanisms of neuropathic pain." Br J Anaesth **87**(1): 12-26.
- Brodermann, M. H. (2016). "Pain, pleasure and placebo: the cannabinoids in reward processing and the perception of pain." Mental Health and Addiction Research **1**(3): 59-63.
- Brooks, J. and I. Tracey (2005). "From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways." J Anat **207**(1): 19-33.
- Burgess, P. R. and E. R. Perl (1967). "Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin." J Physiol **190**(3): 541-562.
- Bushlin, I., R. Rozenfeld, et al. (2010). "Cannabinoid-opioid interactions during neuropathic pain and analgesia." Curr Opin Pharmacol **10**(1): 80-86.
- Calignano, A., G. La Rana, et al. (1998). "Control of pain initiation by endogenous cannabinoids." Nature **394**(6690): 277-281.
- Campbell, J. N. and R. A. Meyer (2006). "Mechanisms of neuropathic pain." Neuron **52**(1): 77-92.
- Caterina, M. J. and D. Julius (2001). "The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway." Annu Rev Neurosci **24**: 487-517.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, et al. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature **389**(6653): 816-824.
- Constantin, C. E., N. Mair, et al. (2008). "Endogenous tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) requires TNF receptor type 2 to generate heat hyperalgesia in a mouse cancer model." J Neurosci **28**(19): 5072-5081.
- Cortright, D. N. and A. Szallasi (2004). "Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update." Eur J Biochem **271**(10): 1814-1819.
- Coull, J. A., D. Boudreau, et al. (2003). "Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain." Nature **424**(6951): 938-942.
- Cristino, L., K. Starowicz, et al. (2008). "Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain." Neuroscience **151**(4): 955-968.
- Cui, M., P. Honore, et al. (2006). "TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists." J Neurosci **26**(37): 9385-9393.

- Cummins, T. R., P. L. Sheets, et al. (2007). "The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain." Pain **131**(3): 243-257.
- Cummins, T. R. and S. G. Waxman (1997). "Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury." J Neurosci **17**(10): 3503-3514.
- Dahlhaus, A., R. Ruscheweyh, et al. (2005). "Synaptic input of rat spinal lamina I projection and unidentified neurones in vitro." J Physiol **566**(Pt 2): 355-368.
- Decosterd, I., R. R. Ji, et al. (2002). "The pattern of expression of the voltage-gated sodium channels Na(v)1.8 and Na(v)1.9 does not change in uninjured primary sensory neurons in experimental neuropathic pain models." Pain **96**(3): 269-277.
- DeLeo, J. A., R. W. Colburn, et al. (1997). "Cytokine and growth factor immunohistochemical spinal profiles in two animal models of mononeuropathy." Brain Res **759**(1): 50-57.
- Devane, W. A., L. Hanus, et al. (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." Science **258**(5090): 1946-1949.
- Di Marzo, V. (2008). "Endocannabinoids: synthesis and degradation." Rev Physiol Biochem Pharmacol **160**: 1-24.
- Di Marzo, V. and L. Cristino (2008). "Why endocannabinoids are not all alike." Nat Neurosci **11**(2): 124-126.
- Di Marzo, V. and L. De Petrocellis (2012). "Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand?" Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **367**(1607): 3216-3228.
- Dib-Hajj, S., J. A. Black, et al. (1996). "Down-regulation of transcripts for Na channel alpha-SNS in spinal sensory neurons following axotomy." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14950-14954.
- Dickie, A. C., B. McCormick, et al. (2017). "Inflammatory Pain Reduces C Fiber Activity-Dependent Slowing in a Sex-Dependent Manner, Amplifying Nociceptive Input to the Spinal Cord." J Neurosci **37**(27): 6488-6502.
- Doly, S., J. Fischer, et al. (2004). "The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes." Neurosci Lett **357**(2): 123-126.
- Dostrovsky, J. O. a. C., A. D. (2005). Wall and Melzack's Textbook of Pain, Churchill Livingstone.
- Dow, R. L., P. A. Carpino, et al. (2009). "Discovery of 2-(2-chlorophenyl)-3-(4-chlorophenyl)-7-(2,2-difluoropropyl)-6,7-dihydro-2H-pyrazolo[3,4-f][1,4]oxazepin-8(5H)-one (PF-514273), a novel, bicyclic lactam-based cannabinoid-1 receptor antagonist for the treatment of obesity." J Med Chem **52**(9): 2652-2655.
- Dubovy, P., R. Jancalek, et al. (2006). "Intra- and extraneuronal changes of immunofluorescence staining for TNF-alpha and TNFR1 in the dorsal root ganglia of rat peripheral neuropathic pain models." Cell Mol Neurobiol **26**(7-8): 1205-1217.
- Durán-Lobato, M., L. Martín-Banderas, et al. (2016). "Lipid nanoparticles as an emerging platform for cannabinoid delivery: physicochemical optimization and biocompatibility." Drug Development and Industrial Pharmacy **42**(2): 190-198.
- Dziadulewicz, E. K., S. J. Bevan, et al. (2007). "Naphthalen-1-yl-(4-pentyloxynaphthalen-1-yl)methanone: a potent, orally bioavailable human

- CB1/CB2 dual agonist with antihyperalgesic properties and restricted central nervous system penetration." J Med Chem **50**(16): 3851-3856.
- Ehrhart, J., D. Obregon, et al. (2005). "Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation." J Neuroinflammation **2**: 29.
- Engel, D. and P. Jonas (2005). "Presynaptic action potential amplification by voltage-gated Na⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons." Neuron **45**(3): 405-417.
- Fang, L., J. Wu, et al. (2002). "Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization." J Neurosci **22**(10): 4196-4204.
- Farquhar-Smith, W. P., M. Egertova, et al. (2000). "Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord." Mol Cell Neurosci **15**(6): 510-521.
- Felder, C. C., K. E. Joyce, et al. (1998). "LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation." J Pharmacol Exp Ther **284**(1): 291-297.
- Fenselau, H., B. Heinke, et al. (2011). "Heterosynaptic long-term potentiation at GABAergic synapses of spinal lamina I neurons." J Neurosci **31**(48): 17383-17391.
- Ferguson, A. R., R. N. Christensen, et al. (2008). "Cell death after spinal cord injury is exacerbated by rapid TNF alpha-induced trafficking of GluR2-lacking AMPARs to the plasma membrane." J Neurosci **28**(44): 11391-11400.
- Fernandez-Carvajal, A., G. Fernandez-Ballester, et al. (2011). "New strategies to develop novel pain therapies: addressing thermoreceptors from different points of view." Pharmaceuticals (Basel) **5**(1): 16-48.
- Fernandez-Ruiz, J., J. Romero, et al. (2007). "Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?" Trends Pharmacol Sci **28**(1): 39-45.
- Ferreira, J., G. L. da Silva, et al. (2004). "Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice." Br J Pharmacol **141**(5): 787-794.
- Ferrini, F., C. Salio, et al. (2007). "Vanilloid receptor-1 (TRPV1)-dependent activation of inhibitory neurotransmission in spinal substantia gelatinosa neurons of mouse." Pain **129**(1-2): 195-209.
- Fezza, F., M. Bari, et al. (2014). "Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes." Molecules **19**(11): 17078-17106.
- Fioravanti, B., M. De Felice, et al. (2008). "Constitutive activity at the cannabinoid CB1 receptor is required for behavioral response to noxious chemical stimulation of TRPV1: antinociceptive actions of CB1 inverse agonists." J Neurosci **28**(45): 11593-11602.
- Fox, A., A. Kessingland, et al. (2001). "The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain." Pain **92**(1-2): 91-100.
- Fukuoka, T., E. Kondo, et al. (2001). "Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model." J Neurosci **21**(13): 4891-4900.
- Galve-Roperh, I., D. Rueda, et al. (2002). "Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor." Mol Pharmacol **62**(6): 1385-1392.

- Gao, Y. J., L. Zhang, et al. (2009). "JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain." J Neurosci **29**(13): 4096-4108.
- Garcia-Sanz, N., A. Fernandez-Carvajal, et al. (2004). "Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor." J Neurosci **24**(23): 5307-5314.
- Garcia, D. E., S. Brown, et al. (1998). "Protein kinase C disrupts cannabinoid actions by phosphorylation of the CB1 cannabinoid receptor." J Neurosci **18**(8): 2834-2841.
- Gardin, A., K. Kucher, et al. (2009). "Cannabinoid receptor agonist 13, a novel cannabinoid agonist: first in human pharmacokinetics and safety." Drug Metab Dispos **37**(4): 827-833.
- Gavva, N. R., A. W. Bannon, et al. (2007). "The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation." J Neurosci **27**(13): 3366-3374.
- Gee, M. D., B. Lynn, et al. (1996). "Activity-dependent slowing of conduction velocity provides a method for identifying different functional classes of C-fibre in the rat saphenous nerve." Neuroscience **73**(3): 667-675.
- Gees, M., B. Colsoul, et al. (2010). "The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(10): a003962.
- George, S. R., B. F. O'Dowd, et al. (2002). "G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery." Nat Rev Drug Discov **1**(10): 808-820.
- Gerard, C., C. Mollereau, et al. (1990). "Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA." Nucleic Acids Res **18**(23): 7142.
- Gerdeman, G. L., J. Ronesi, et al. (2002). "Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum." Nat Neurosci **5**(5): 446-451.
- Glass, M. and C. C. Felder (1997). "Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor." J Neurosci **17**(14): 5327-5333.
- Gold, M. S., D. Weinreich, et al. (2003). "Redistribution of Na^V1.8 in Uninjured Axons Enables Neuropathic Pain." The Journal of Neuroscience **23**(1): 158-166.
- Gomez Del Pulgar, T., M. L. De Ceballos, et al. (2002). "Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway." J Biol Chem **277**(39): 36527-36533.
- Grewal, S. S., R. D. York, et al. (1999). "Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons." Curr Opin Neurobiol **9**(5): 544-553.
- Griebel, G., J. Stemmelin, et al. (2018). "The selective reversible FAAH inhibitor, SSR411298, restores the development of maladaptive behaviors to acute and chronic stress in rodents." Sci Rep **8**(1): 2416.
- Grycova, L., B. Holendova, et al. (2012). "Integrative binding sites within intracellular termini of TRPV1 receptor." PLoS One **7**(10): e48437.
- Guindon, J., Y. Lai, et al. (2013). "Alterations in endocannabinoid tone following chemotherapy-induced peripheral neuropathy: effects of endocannabinoid deactivation inhibitors targeting fatty-acid amide hydrolase and

- monoacylglycerol lipase in comparison to reference analgesics following cisplatin treatment." *Pharmacol Res* **67**(1): 94-109.
- Gunthorpe, M. J., H. K. Rami, et al. (2004). "Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist." *Neuropharmacology* **46**(1): 133-149.
- Guo, A., L. Vulchanova, et al. (1999). "Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites." *Eur J Neurosci* **11**(3): 946-958.
- Haanpaa, M. and R. D. Treede (2012). "Capsaicin for neuropathic pain: linking traditional medicine and molecular biology." *Eur Neurol* **68**(5): 264-275.
- Hamill, O. P., A. Marty, et al. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch* **391**(2): 85-100.
- Hampson, R. E., G. J. Evans, et al. (1995). "Role of cyclic AMP dependent protein kinase in cannabinoid receptor modulation of potassium "A-current" in cultured rat hippocampal neurons." *Life Sci* **56**(23-24): 2081-2088.
- He, X. H., Y. Zang, et al. (2010). "TNF-alpha contributes to up-regulation of Nav1.3 and Nav1.8 in DRG neurons following motor fiber injury." *Pain* **151**(2): 266-279.
- Hegyi, Z., K. Hollo, et al. (2012). "Differential distribution of diacylglycerol lipase-alpha and N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase d immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rats." *Glia* **60**(9): 1316-1329.
- Hegyi, Z., G. Kis, et al. (2009). "Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial spinal dorsal horn of the rodent spinal cord." *Eur J Neurosci* **30**(2): 251-262.
- Henrich, F., W. Magerl, et al. (2015). "Capsaicin-sensitive C- and A-fibre nociceptors control long-term potentiation-like pain amplification in humans." *Brain* **138**(Pt 9): 2505-2520.
- Hensellek, S., P. Brell, et al. (2007). "The cytokine TNFalpha increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation." *Mol Cell Neurosci* **36**(3): 381-391.
- Hermann, H., L. De Petrocellis, et al. (2003). "Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response." *Cell Mol Life Sci* **60**(3): 607-616.
- Hildebrand, M. E., J. Xu, et al. (2016). "Potentiation of Synaptic GluN2B NMDAR Currents by Fyn Kinase Is Gated through BDNF-Mediated Disinhibition in Spinal Pain Processing." *Cell Rep* **17**(10): 2753-2765.
- Ho, B. Y., Y. Uezono, et al. (1999). "Coupling of the expressed cannabinoid CB1 and CB2 receptors to phospholipase C and G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels." *Receptors Channels* **6**(5): 363-374.
- Ho, K. W., N. J. Ward, et al. (2012). "TRPV1: a stress response protein in the central nervous system." *Am J Neurodegener Dis* **1**(1): 1-14.
- Hohmann, A. G. and M. Herkenham (1999). "Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves." *Neuroscience* **92**(4): 1171-1175.
- Hohmann, A. G., W. J. Martin, et al. (1995). "Inhibition of noxious stimulus-evoked activity of spinal cord dorsal horn neurons by the cannabinoid WIN 55,212-2." *Life Sci* **56**(23-24): 2111-2118.
- Hohmann, A. G., K. Tsou, et al. (1998). "Cannabinoid modulation of wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat by spinally administered WIN55,212-2." *Neurosci Lett* **257**(3): 119-122.

- Horvath, G., G. Kekesi, et al. (2008). "The role of TRPV1 receptors in the antinociceptive effect of anandamide at spinal level." Pain **134**(3): 277-284.
- Howlett, A. C., L. C. Blume, et al. (2010). "CB(1) cannabinoid receptors and their associated proteins." Curr Med Chem **17**(14): 1382-1393.
- Howlett, A. C. and S. Mukhopadhyay (2000). "Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol." Chem Phys Lipids **108**(1-2): 53-70.
- Howlett, A. C., P. H. Reggio, et al. (2011). "Endocannabinoid tone versus constitutive activity of cannabinoid receptors." Br J Pharmacol **163**(7): 1329-1343.
- Hsia, A. Y., R. C. Malenka, et al. (1998). "Development of excitatory circuitry in the hippocampus." J Neurophysiol **79**(4): 2013-2024.
- Hsieh, C., S. Brown, et al. (1999). "Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor." J Neurochem **73**(2): 493-501.
- Hua, T., K. Vemuri, et al. (2016). "Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1." Cell **167**(3): 750-762 e714.
- Huang, C. C., Y. L. Chen, et al. (2002). "Activation of cAMP-dependent protein kinase suppresses the presynaptic cannabinoid inhibition of glutamatergic transmission at corticostriatal synapses." Mol Pharmacol **61**(3): 578-585.
- Huang, J., X. Zhang, et al. (2006). "Modulation of temperature-sensitive TRP channels." Semin Cell Dev Biol **17**(6): 638-645.
- Huggins, J. P., T. S. Smart, et al. (2012). "An efficient randomised, placebo-controlled clinical trial with the irreversible fatty acid amide hydrolase-1 inhibitor PF-04457845, which modulates endocannabinoids but fails to induce effective analgesia in patients with pain due to osteoarthritis of the knee." Pain **153**(9): 1837-1846.
- Hunt, S. P. and P. W. Mantyh (2001). "The molecular dynamics of pain control." Nat Rev Neurosci **2**(2): 83-91.
- Hwang, S. J., A. Burette, et al. (2004). "Vanilloid receptor VR1-positive primary afferents are glutamatergic and contact spinal neurons that co-express neurokinin receptor NK1 and glutamate receptors." J Neurocytol **33**(3): 321-329.
- Hwang, S. J., A. Burette, et al. (2003). "VR1-positive primary afferents contact NK1-positive spinoparabrachial neurons." J Comp Neurol **460**(2): 255-265.
- Hwang, S. W., H. Cho, et al. (2000). "Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 6155-6160.
- Chaikin, P. (2017). "The Bial 10-2474 Phase 1 Study-A Drug Development Perspective and Recommendations for Future First-in-Human Trials." J Clin Pharmacol **57**(6): 690-703.
- Chemin, J., A. Monteil, et al. (2001). "Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide." EMBO J **20**(24): 7033-7040.
- Chen, J. T., D. Guo, et al. (2014). "Presynaptic GABAergic inhibition regulated by BDNF contributes to neuropathic pain induction." Nat Commun **5**: 5331.
- Chen, S. R., Y. M. Hu, et al. (2014). "Calcineurin inhibitor induces pain hypersensitivity by potentiating pre- and postsynaptic NMDA receptor activity in spinal cords." J Physiol **592**(1): 215-227.

- Chen, X., R. P. Pang, et al. (2011). "TNF-alpha enhances the currents of voltage gated sodium channels in uninjured dorsal root ganglion neurons following motor nerve injury." Exp Neurol **227**(2): 279-286.
- Chen, Y., H. H. Willcockson, et al. (2009). "Influence of the vanilloid receptor TRPV1 on the activation of spinal cord glia in mouse models of pain." Exp Neurol **220**(2): 383-390.
- CHMP (2018). Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human and early clinical trials with investigational medicinal products. EMA/CHMP/SWP/28367/07 Rev. 1. E. M. Agency.
- Choi, J. I., C. I. Svensson, et al. (2010). "Peripheral inflammation induces tumor necrosis factor dependent AMPA receptor trafficking and Akt phosphorylation in spinal cord in addition to pain behavior." Pain **149**(2): 243-253.
- Chuang, H. H., E. D. Prescott, et al. (2001). "Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition." Nature **411**(6840): 957-962.
- Ibrahim, M. M., F. Porreca, et al. (2005). "CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 3093-3098.
- Ikeda-Miyagawa, Y., K. Kobayashi, et al. (2015). "Peripherally increased artemin is a key regulator of TRPA1/V1 expression in primary afferent neurons." Mol Pain **11**: 8.
- Jancalek, R., P. Dubovy, et al. (2010). "Bilateral changes of TNF-alpha and IL-10 protein in the lumbar and cervical dorsal root ganglia following a unilateral chronic constriction injury of the sciatic nerve." J Neuroinflammation **7**: 11.
- Jara-Oseguera, A., S. A. Simon, et al. (2008). "TRPV1: on the road to pain relief." Curr Mol Pharmacol **1**(3): 255-269.
- Jennings, E. A., C. W. Vaughan, et al. (2003). "The actions of anandamide on rat superficial medullary dorsal horn neurons in vitro." J Physiol **548**(Pt 1): 121-129.
- Jensen, T. and J. G. Edwards (2012). "Calcineurin is required for TRPV1-induced long-term depression of hippocampal interneurons." Neurosci Lett **510**(2): 82-87.
- Jensen, T. S. and N. B. Finnerup (2014). "Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms." Lancet Neurol **13**(9): 924-935.
- Jeske, N. A., A. M. Patwardhan, et al. (2009). "Fibronectin stimulates TRPV1 translocation in primary sensory neurons." J Neurochem **108**(3): 591-600.
- Ji, R. R., T. Kohno, et al. (2003). "Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms?" Trends Neurosci **26**(12): 696-705.
- Ji, R. R., T. A. Samad, et al. (2002). "p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia." Neuron **36**(1): 57-68.
- Jin, S. X., Z. Y. Zhuang, et al. (2003). "p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain." J Neurosci **23**(10): 4017-4022.
- Jin, W., S. Brown, et al. (1999). "Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization." J Neurosci **19**(10): 3773-3780.

- Jin, X. and R. W. t. Gereau (2006). "Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α ." J Neurosci **26**(1): 246-255.
- Johanek, L. M., D. R. Heitmiller, et al. (2001). "Cannabinoids attenuate capsaicin-evoked hyperalgesia through spinal and peripheral mechanisms." Pain **93**(3): 303-315.
- Johanek, L. M. and D. A. Simone (2004). "Activation of peripheral cannabinoid receptors attenuates cutaneous hyperalgesia produced by a heat injury." Pain **109**(3): 432-442.
- Jordt, S. E. and D. Julius (2002). "Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers." Cell **108**(3): 421-430.
- Joshi, S. K., J. P. Mikusa, et al. (2006). "Involvement of the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states." Pain **123**(1-2): 75-82.
- Julius, D. and A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." Nature **413**(6852): 203-210.
- Jung, J., S. W. Hwang, et al. (1999). "Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel." J Neurosci **19**(2): 529-538.
- Jung, J., J. S. Shin, et al. (2004). "Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding." J Biol Chem **279**(8): 7048-7054.
- Kanai, Y., E. Nakazato, et al. (2005). "Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats." Neuropharmacology **49**(7): 977-984.
- Kano, M., T. Ohno-Shosaku, et al. (2009). "Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission." Physiol Rev **89**(1): 309-380.
- Kao, D. J., A. H. Li, et al. (2012). "CC chemokine ligand 2 upregulates the current density and expression of TRPV1 channels and $\text{Na}(\text{v})1.8$ sodium channels in dorsal root ganglion neurons." J Neuroinflammation **9**: 189.
- Katona, I. and T. F. Freund (2008). "Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease." Nat Med **14**(9): 923-930.
- Kawasaki, Y., L. Zhang, et al. (2008). "Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord." J Neurosci **28**(20): 5189-5194.
- Keith, J. M., W. M. Jones, et al. (2015). "Preclinical Characterization of the FAAH Inhibitor JNJ-42165279." ACS Med Chem Lett **6**(12): 1204-1208.
- Kelly, S. and V. Chapman (2003). "Cannabinoid CB1 receptor inhibition of mechanically evoked responses of spinal neurones in control rats, but not in rats with hindpaw inflammation." Eur J Pharmacol **474**(2-3): 209-216.
- Khan, A. A., A. Diogenes, et al. (2008). "Tumor necrosis factor α enhances the sensitivity of rat trigeminal neurons to capsaicin." Neuroscience **155**(2): 503-509.
- Khasabova, I. A., S. G. Khasabov, et al. (2008). "A decrease in anandamide signaling contributes to the maintenance of cutaneous mechanical hyperalgesia in a model of bone cancer pain." J Neurosci **28**(44): 11141-11152.
- Kim, H. I., T. H. Kim, et al. (2005). "Anandamide suppression of Na^+ currents in rat dorsal root ganglion neurons." Brain Res **1062**(1-2): 39-47.
- Kim, S. R., S. U. Kim, et al. (2006). "Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca^{2+} -mediated

- mitochondrial damage and cytochrome c release." J Immunol **177**(7): 4322-4329.
- Kim, S. Y., J. C. Bae, et al. (2002). "Activation of p38 MAP kinase in the rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation and nerve injury." Neuroreport **13**(18): 2483-2486.
- Kim, Y. H., S. K. Back, et al. (2012). "TRPV1 in GABAergic interneurons mediates neuropathic mechanical allodynia and disinhibition of the nociceptive circuitry in the spinal cord." Neuron **74**(4): 640-647.
- Kohno, T., K. A. Moore, et al. (2003). "Peripheral nerve injury alters excitatory synaptic transmission in lamina II of the rat dorsal horn." J Physiol **548**(Pt 1): 131-138.
- Kochukov, M. Y., T. A. McNearney, et al. (2009). "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) enhances functional thermal and chemical responses of TRP cation channels in human synoviocytes." Mol Pain **5**: 49.
- Koplas, P. A., R. L. Rosenberg, et al. (1997). "The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons." J Neurosci **17**(10): 3525-3537.
- Kosersky, D. S., W. L. Dewey, et al. (1973). "Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory effects of delta 9-tetrahydrocannabinol in the rat." Eur J Pharmacol **24**(1): 1-7.
- Kouznetsova, M., B. Kelley, et al. (2002). "Desensitization of cannabinoid-mediated presynaptic inhibition of neurotransmission between rat hippocampal neurons in culture." Mol Pharmacol **61**(3): 477-485.
- Kwilasz, A. J., R. A. Abdullah, et al. (2014). "Effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on pain-stimulated and pain-depressed behavior in rats." Behav Pharmacol **25**(2): 119-129.
- Lai, J., M. S. Gold, et al. (2002). "Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8." Pain **95**(1-2): 143-152.
- Lappin, S. C., A. D. Randall, et al. (2006). "TRPV1 antagonist, SB-366791, inhibits glutamatergic synaptic transmission in rat spinal dorsal horn following peripheral inflammation." Eur J Pharmacol **540**(1-3): 73-81.
- Ledent, C., O. Valverde, et al. (1999). "Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice." Science **283**(5400): 401-404.
- Leung, L. and C. M. Cahill (2010). "TNF-alpha and neuropathic pain--a review." J Neuroinflammation **7**: 27.
- Li, G. L., H. Winter, et al. (2012). "Assessment of the pharmacology and tolerability of PF-04457845, an irreversible inhibitor of fatty acid amide hydrolase-1, in healthy subjects." Br J Clin Pharmacol **73**(5): 706-716.
- Li, Y., A. Ji, et al. (2004). "Cell-Specific Expression and Lipopolysaccharide-Induced Regulation of Tumor Necrosis Factor α (TNF α) and TNF Receptors in Rat Dorsal Root Ganglion." The Journal of Neuroscience **24**(43): 9623-9631.
- Lim, G., B. Sung, et al. (2003). "Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of Win 55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats." Pain **105**(1-2): 275-283.
- Lishko, P. V., E. Procko, et al. (2007). "The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity." Neuron **54**(6): 905-918.
- Liu, J., B. Gao, et al. (2000). "Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells." Biochem J **346 Pt 3**: 835-840.

- Liu, J., L. Wang, et al. (2008). "Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide." Neuropharmacology **54**(1): 1-7.
- Liu, Y. L., L. J. Zhou, et al. (2007). "Tumor necrosis factor-alpha induces long-term potentiation of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn in rats with nerve injury: the role of NF-kappa B, JNK and p38 MAPK." Neuropharmacology **52**(3): 708-715.
- Loeser, J. D. and R. D. Treede (2008). "The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology." Pain **137**(3): 473-477.
- Lukacs, V., B. Thyagarajan, et al. (2007). "Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides." J Neurosci **27**(26): 7070-7080.
- Lukyanetz, E. A. (1997). "Evidence for colocalization of calcineurin and calcium channels in dorsal root ganglion neurons." Neuroscience **78**(3): 625-628.
- Maccarrone, M., S. Rossi, et al. (2008). "Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum." Nat Neurosci **11**(2): 152-159.
- Mackie, K. (2005). "Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization." Life Sci **77**(14): 1667-1673.
- Maione, S., T. Bisogno, et al. (2006). "Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors." J Pharmacol Exp Ther **316**(3): 969-982.
- Malarkey, K., C. M. Belham, et al. (1995). "The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors." Biochem J **309** (Pt 2): 361-375.
- Malek, N., M. Kucharczyk, et al. (2014). "Alterations in the anandamide metabolism in the development of neuropathic pain." Biomed Res Int **2014**: 686908.
- Mallet, C., C. Dubray, et al. (2016). "FAAH inhibitors in the limelight, but regrettably." Int J Clin Pharmacol Ther **54**(7): 498-501.
- Marchand, F., M. Perretti, et al. (2005). "Role of the immune system in chronic pain." Nat Rev Neurosci **6**(7): 521-532.
- Martin, W. J., C. M. Loo, et al. (1999). "Spinal cannabinoids are anti-allodynic in rats with persistent inflammation." Pain **82**(2): 199-205.
- Masuoka, T., M. Kudo, et al. (2016). "Long-Term Activation of Group I Metabotropic Glutamate Receptors Increases Functional TRPV1-Expressing Neurons in Mouse Dorsal Root Ganglia." Front Cell Neurosci **10**: 79.
- Matsuda, L. A., S. J. Lolait, et al. (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA." Nature **346**(6284): 561-564.
- McMahon, S. B., W. B. Cafferty, et al. (2005). "Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators." Exp Neurol **192**(2): 444-462.
- Meacham, K., A. Shepherd, et al. (2017). "Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms." Curr Pain Headache Rep **21**(6): 28.
- Meeus, M., S. Vervisch, et al. (2012). "Central sensitization in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review." Semin Arthritis Rheum **41**(4): 556-567.
- Mendell, L. M. (1984). "Modifiability of spinal synapses." Physiol Rev **64**(1): 260-324.
- Millan, M. J. (1999). "The induction of pain: an integrative review." Prog Neurobiol **57**(1): 1-164.

- Millns, P. J., M. Chimenti, et al. (2006). "Effects of inhibition of fatty acid amide hydrolase vs. the anandamide membrane transporter on TRPV1-mediated calcium responses in adult DRG neurons; the role of CB receptors." Eur J Neurosci **24**(12): 3489-3495.
- Moalem, G. and D. J. Tracey (2006). "Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain." Brain Res Rev **51**(2): 240-264.
- Mohapatra, D. P. and C. Nau (2003). "Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway." J Biol Chem **278**(50): 50080-50090.
- Moreno-Martet, M., L. Mestre, et al. (2012). "Identification of receptors and enzymes for endocannabinoids in NSC-34 cells: relevance for in vitro studies with cannabinoids in motor neuron diseases." Neurosci Lett **508**(2): 67-72.
- Morisset, V. and L. Urban (2001). "Cannabinoid-induced presynaptic inhibition of glutamatergic EPSCs in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord." J Neurophysiol **86**(1): 40-48.
- Mosby Inc. (2009). Mosby's medical dictionary. St. Louis, MO, Mosby.
- Mrozkova, P., J. Palecek, et al. (2016). "The role of protease-activated receptor type 2 in nociceptive signaling and pain." Physiol Res **65**(3): 357-367.
- Mrozkova, P., D. Spicarova, et al. (2016). "Hypersensitivity Induced by Activation of Spinal Cord PAR2 Receptors Is Partially Mediated by TRPV1 Receptors." PLoS One **11**(10): e0163991.
- Nagy, B., C. Fedonidis, et al. (2009). "Capsaicin-sensitive primary sensory neurons in the mouse express N-Acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D." Neuroscience **161**(2): 572-577.
- Nerandzic, V., P. Mrozkova, et al. (2017). "Peripheral inflammation affects modulation of nociceptive synaptic transmission in the spinal cord induced by N-arachidonoylphosphatidylethanolamine." Br J Pharmacol.
- Nicol, G. D., J. C. Lopshire, et al. (1997). "Tumor necrosis factor enhances the capsaicin sensitivity of rat sensory neurons." J Neurosci **17**(3): 975-982.
- Niehaus, J. L., Y. Liu, et al. (2007). "CB1 cannabinoid receptor activity is modulated by the cannabinoid receptor interacting protein CRIP 1a." Mol Pharmacol **72**(6): 1557-1566.
- Nichols, R. A., G. R. Suplick, et al. (1994). "Calcineurin-mediated protein dephosphorylation in brain nerve terminals regulates the release of glutamate." J Biol Chem **269**(38): 23817-23823.
- Nilius, B., G. Owsianik, et al. (2007). "Transient receptor potential cation channels in disease." Physiol Rev **87**(1): 165-217.
- Nyilas, R., L. C. Gregg, et al. (2009). "Molecular architecture of endocannabinoid signaling at nociceptive synapses mediating analgesia." Eur J Neurosci **29**(10): 1964-1978.
- O'Sullivan, S. E. (2007). "Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors." Br J Pharmacol **152**(5): 576-582.
- Ohtori, S., K. Takahashi, et al. (2004). "TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord." Spine (Phila Pa 1976) **29**(10): 1082-1088.
- Okamoto, Y., J. Morishita, et al. (2004). "Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners." J Biol Chem **279**(7): 5298-5305.

- Okine, B. N., L. M. Norris, et al. (2012). "Lack of effect of chronic pre-treatment with the FAAH inhibitor URB597 on inflammatory pain behaviour: evidence for plastic changes in the endocannabinoid system." Br J Pharmacol **167**(3): 627-640.
- Okura, D., T. Horishita, et al. (2014). "The endocannabinoid anandamide inhibits voltage-gated sodium channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7, and Nav1.8 in *Xenopus oocytes*." Anesth Analg **118**(3): 554-562.
- Oldham, W. M. and H. E. Hamm (2008). "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 60-71.
- Oseguera, A. J., L. D. Islas, et al. (2007). "On the mechanism of TBA block of the TRPV1 channel." Biophys J **92**(11): 3901-3914.
- Palazzo, E., L. Luongo, et al. (2012). "Changes in cannabinoid receptor subtype 1 activity and interaction with metabotropic glutamate subtype 5 receptors in the periaqueductal gray-rostral ventromedial medulla pathway in a rodent neuropathic pain model." CNS Neurol Disord Drug Targets **11**(2): 148-161.
- Palecek, J. I., G. Abdrachmanova, et al. (1999). "Properties of NMDA receptors in rat spinal cord motoneurons." Eur J Neurosci **11**(3): 827-836.
- Park, C. K., N. Lu, et al. (2011). "Resolving TRPV1- and TNF-alpha-mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1." J Neurosci **31**(42): 15072-15085.
- Patapoutian, A., S. Tate, et al. (2009). "Transient receptor potential channels: targeting pain at the source." Nat Rev Drug Discov **8**(1): 55-68.
- Patestas, M. A. and L. P. Gartner (2006). A textbook of neuroanatomy. Malden, MA, Blackwell Pub.
- Payne, C. E., A. R. Brown, et al. (2015). "A novel selective and orally bioavailable Nav 1.8 channel blocker, PF-01247324, attenuates nociception and sensory neuron excitability." Br J Pharmacol **172**(10): 2654-2670.
- Pernia-Andrade, A. J., A. Kato, et al. (2009). "Spinal endocannabinoids and CB1 receptors mediate C-fiber-induced heterosynaptic pain sensitization." Science **325**(5941): 760-764.
- Pertwee, R. G. (1999). "Pharmacology of cannabinoid receptor ligands." Curr Med Chem **6**(8): 635-664.
- Pertwee, R. G. (2001). "Cannabinoid receptors and pain." Prog Neurobiol **63**(5): 569-611.
- Pertwee, R. G. (2006). "The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview." Int J Obes (Lond) **30 Suppl 1**: S13-18.
- Pertwee, R. G. (2009). "Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines." Br J Pharmacol **156**(3): 397-411.
- Piomelli, D. and O. Sasso (2014). "Peripheral gating of pain signals by endogenous lipid mediators." Nat Neurosci **17**(2): 164-174.
- Pospisilova, E. and J. Palecek (2006). "Post-operative pain behavior in rats is reduced after single high-concentration capsaicin application." Pain **125**(3): 233-243.
- Raghavendra, V., F. Y. Tanga, et al. (2004). "Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS." Eur J Neurosci **20**(2): 467-473.
- Randic, M., M. C. Jiang, et al. (1993). "Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord." J Neurosci **13**(12): 5228-5241.

- Rathee, P. K., C. Distler, et al. (2002). "PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia." J Neurosci **22**(11): 4740-4745.
- Ren, K. and R. Dubner (1999). "Inflammatory Models of Pain and Hyperalgesia." ILAR J **40**(3): 111-118.
- Rexed, B. (1952). "The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat." J Comp Neurol **96**(3): 414-495.
- Richardson, J. D., L. Aanonsen, et al. (1998). "Hypoactivity of the spinal cannabinoid system results in NMDA-dependent hyperalgesia." J Neurosci **18**(1): 451-457.
- Richardson, J. D., S. Kilo, et al. (1998). "Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors." Pain **75**(1): 111-119.
- Robinson, A. J. and J. M. Dickenson (2001). "Activation of the p38 and p42/p44 mitogen-activated protein kinase families by the histamine H(1) receptor in DDT(1)MF-2 cells." Br J Pharmacol **133**(8): 1378-1386.
- Ross, R. A. (2003). "Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors." Br J Pharmacol **140**(5): 790-801.
- Rueda, D., I. Galve-Roperh, et al. (2000). "The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase." Mol Pharmacol **58**(4): 814-820.
- Sagar, D. R., S. Kelly, et al. (2005). "Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats." Eur J Neurosci **22**(2): 371-379.
- Salio, C., S. Doly, et al. (2002). "Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord." Neurosci Lett **329**(1): 13-16.
- Sandkuhler, J. (2009). "Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia." Physiol Rev **89**(2): 707-758.
- Sanudo-Pena, M. C., N. M. Strangman, et al. (1999). "CB1 receptor localization in rat spinal cord and roots, dorsal root ganglion, and peripheral nerve." Zhongguo Yao Li Xue Bao **20**(12): 1115-1120.
- Shao, D., K. Okuse, et al. (2009). "Protein-protein interactions involving voltage-gated sodium channels: Post-translational regulation, intracellular trafficking and functional expression." Int J Biochem Cell Biol **41**(7): 1471-1481.
- Shao, Z., J. Yin, et al. (2016). "High-resolution crystal structure of the human CB1 cannabinoid receptor." Nature.
- Shim, B., M. Ringkamp, et al. (2007). "Activity-dependent slowing of conduction velocity in uninjured L4 C fibers increases after an L5 spinal nerve injury in the rat." Pain **128**(1-2): 40-51.
- Shire, D., B. Calandra, et al. (1996). "Structural features of the central cannabinoid CB1 receptor involved in the binding of the specific CB1 antagonist SR 141716A." J Biol Chem **271**(12): 6941-6946.
- Shubayev, V. I. and R. R. Myers (2001). "Axonal transport of TNF-alpha in painful neuropathy: distribution of ligand tracer and TNF receptors." J Neuroimmunol **114**(1-2): 48-56.
- Schafers, M., C. Geis, et al. (2002). "Anterograde transport of tumor necrosis factor-alpha in the intact and injured rat sciatic nerve." J Neurosci **22**(2): 536-545.

- Schafers, M., C. Geis, et al. (2003). "Selective increase of tumour necrosis factor- α in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve." Eur J Neurosci **17**(4): 791-804.
- Schafers, M., C. Sommer, et al. (2008). "Selective stimulation of either tumor necrosis factor receptor differentially induces pain behavior in vivo and ectopic activity in sensory neurons in vitro." Neuroscience **157**(2): 414-423.
- Schafers, M., L. S. Sorkin, et al. (2003). "Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat." Neurosci Lett **347**(3): 179-182.
- Scheuer, T. (2011). "Regulation of sodium channel activity by phosphorylation." Semin Cell Dev Biol **22**(2): 160-165.
- Scholz, J. and C. J. Woolf (2002). "Can we conquer pain?" Nat Neurosci **5 Suppl**: 1062-1067.
- Scholz, J. and C. J. Woolf (2007). "The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia." Nat Neurosci **10**(11): 1361-1368.
- Sihra, T. S., A. C. Nairn, et al. (1995). "A role for calcineurin (protein phosphatase-2B) in the regulation of glutamate release." Biochem Biophys Res Commun **212**(2): 609-616.
- Simone, D. A., T. K. Baumann, et al. (1989). "Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin." Pain **38**(1): 99-107.
- Singh Tahim, A., P. Santha, et al. (2005). "Inflammatory mediators convert anandamide into a potent activator of the vanilloid type 1 transient receptor potential receptor in nociceptive primary sensory neurons." Neuroscience **136**(2): 539-548.
- Smith, G. D., M. J. Gunthorpe, et al. (2002). "TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein." Nature **418**(6894): 186-190.
- Snider, W. D. and S. B. McMahon (1998). "Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors." Neuron **20**(4): 629-632.
- Sommer, C., C. Schmidt, et al. (1998). "Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1." Exp Neurol **151**(1): 138-142.
- Sousa-Valente, J., A. Varga, et al. (2014). "Anandamide in primary sensory neurons: too much of a good thing?" Eur J Neurosci **39**(3): 409-418.
- Sousa-Valente, J., A. Varga, et al. (2017). "Inflammation of peripheral tissues and injury to peripheral nerves induce differing effects in the expression of the calcium-sensitive N-arachidonoyl ethanolamine-synthesizing enzyme and related molecules in rat primary sensory neurons." J Comp Neurol **525**(8): 1778-1796.
- Spicarova, D., P. Adamek, et al. (2014). "TRPV1 receptor inhibition decreases CCL2-induced hyperalgesia." Neuropharmacology **81**: 75-84.
- Spicarova, D., V. Nerandzic, et al. (2011). "Modulation of spinal cord synaptic activity by tumor necrosis factor α in a model of peripheral neuropathy." J Neuroinflammation **8**: 177.
- Spicarova, D., V. Nerandzic, et al. (2014). "Update on the role of spinal cord TRPV1 receptors in pain modulation." Physiol Res **63 Suppl 1**: S225-236.
- Spicarova, D. and J. Palecek (2008). "The role of spinal cord vanilloid (TRPV1) receptors in pain modulation." Physiol Res **57 Suppl 3**: S69-77.

- Spicarova, D. and J. Palecek (2009). "The role of the TRPV1 endogenous agonist N-Oleoyldopamine in modulation of nociceptive signaling at the spinal cord level." J Neurophysiol **102**(1): 234-243.
- Spicarova, D. and J. Palecek (2010). "Modulation of AMPA excitatory postsynaptic currents in the spinal cord dorsal horn neurons by insulin." Neuroscience **166**(1): 305-311.
- Spicarova, D. and J. Palecek (2010). "Tumor necrosis factor alpha sensitizes spinal cord TRPV1 receptors to the endogenous agonist N-oleoyldopamine." J Neuroinflammation **7**: 49.
- Staaf, S., S. Oerther, et al. (2009). "Differential regulation of TRP channels in a rat model of neuropathic pain." Pain **144**(1-2): 187-199.
- Stambouliau, S., J. S. Choi, et al. (2010). "ERK1/2 mitogen-activated protein kinase phosphorylates sodium channel Na(v)1.7 and alters its gating properties." J Neurosci **30**(5): 1637-1647.
- Starowicz, K., W. Makuch, et al. (2012). "Spinal anandamide produces analgesia in neuropathic rats: possible CB(1)- and TRPV1-mediated mechanisms." Neuropharmacology **62**(4): 1746-1755.
- Starowicz, K. and B. Przewlocka (2012). "Modulation of neuropathic-pain-related behaviour by the spinal endocannabinoid/endovanilloid system." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **367**(1607): 3286-3299.
- Stella, N. (2004). "Cannabinoid signaling in glial cells." Glia **48**(4): 267-277.
- Sugiura, T., M. Tominaga, et al. (2002). "Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1." J Neurophysiol **88**(1): 544-548.
- Szallasi, A. and P. M. Blumberg (1999). "Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms." Pharmacol Rev **51**(2): 159-212.
- Szallasi, A. and P. M. Blumberg (2007). Complex Regulation of TRPV1 by Vanilloids. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. W. B. Liedtke and S. Heller. Boca Raton (FL).
- Szallasi, A. and C. Goso (1994). "Characterization by [3H]resiniferatoxin binding of a human vanilloid (capsaicin) receptor in post-mortem spinal cord." Neurosci Lett **165**(1-2): 101-104.
- Todd, A. J. (2002). "Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor." Exp Physiol **87**(2): 245-249.
- Tominaga, M., M. J. Caterina, et al. (1998). "The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli." Neuron **21**(3): 531-543.
- Tominaga, M., M. Wada, et al. (2001). "Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6951-6956.
- Toth, C. C., N. M. Jedrzejewski, et al. (2010). "Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain." Mol Pain **6**: 16.
- Touska, F., L. Marsakova, et al. (2011). "A "cute" desensitization of TRPV1." Curr Pharm Biotechnol **12**(1): 122-129.
- Towers, S., A. Princivalle, et al. (2000). "GABAB receptor protein and mRNA distribution in rat spinal cord and dorsal root ganglia." Eur J Neurosci **12**(9): 3201-3210.
- Tracey, I. and P. W. Mantyh (2007). "The cerebral signature for pain perception and its modulation." Neuron **55**(3): 377-391.

- Tsou, K., S. Brown, et al. (1998). "Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system." Neuroscience **83**(2): 393-411.
- Turu, G. and L. Hunyady (2010). "Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor." J Mol Endocrinol **44**(2): 75-85.
- Ueda, H. (2008). "Peripheral mechanisms of neuropathic pain - involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination." Mol Pain **4**: 11.
- Valtschanoff, J. G., A. Rustioni, et al. (2001). "Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn." J Comp Neurol **436**(2): 225-235.
- van der Stelt, M., M. Trevisani, et al. (2005). "Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca²⁺ influx via TRPV1 channels." EMBO J **24**(17): 3026-3037.
- Varga, A., A. Jenés, et al. (2014). "Anandamide produced by Ca(2+)-insensitive enzymes induces excitation in primary sensory neurons." Pflügers Arch **466**(7): 1421-1435.
- Vellani, V., S. Petrosino, et al. (2008). "Functional lipidomics. Calcium-independent activation of endocannabinoid/endovanilloid lipid signalling in sensory neurons by protein kinases C and A and thrombin." Neuropharmacology **55**(8): 1274-1279.
- Veress, G., Z. Meszar, et al. (2013). "Characterisation of cannabinoid 1 receptor expression in the perikarya, and peripheral and spinal processes of primary sensory neurons." Brain Struct Funct **218**(3): 733-750.
- Vergnolle, N., N. W. Bunnett, et al. (2001). "Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway." Nat Med **7**(7): 821-826.
- Vlachova, V., J. Teisinger, et al. (2003). "Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1." J Neurosci **23**(4): 1340-1350.
- Vogel, C., S. Stallforth, et al. (2006). "Altered pain behavior and regeneration after nerve injury in TNF receptor deficient mice." J Peripher Nerv Syst **11**(4): 294-303.
- Von Roenn, J. H. (2006). Current diagnosis & treatment of pain / edited by Jamie H. Von Roenn, Judith A. Paice, Michael E. Preodor. New York, Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Pub. Division, c2006.
- Vydyanathan, A., Z. Z. Wu, et al. (2005). "A-type voltage-gated K⁺ currents influence firing properties of isolectin B4-positive but not isolectin B4-negative primary sensory neurons." J Neurophysiol **93**(6): 3401-3409.
- Wager-Miller, J., R. Westenbroek, et al. (2002). "Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example." Chem Phys Lipids **121**(1-2): 83-89.
- Wang, X. C., S. Wang, et al. (2016). "Alpha-Dendrotoxin-sensitive Kv1 channels contribute to conduction failure of polymodal nociceptive C-fibers from rat coccygeal nerve." J Neurophysiol **115**(2): 947-957.
- Waxman, S. G., J. D. Kocsis, et al. (1994). "Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy." J Neurophysiol **72**(1): 466-470.
- Wikimedia. (2017, 23 January 2016 06:48 UTC). "Medulla spinalis - Substantia grisea - English.svg." Retrieved 20 September, 2017, from https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Medulla_spinalis_-_Substantia_grisea_-_English.svg&oldid=185381382.

- Wilkerson, J. L., M. J. Niphakis, et al. (2016). "The Selective Monoacylglycerol Lipase Inhibitor MJN110 Produces Opioid-Sparing Effects in a Mouse Neuropathic Pain Model." J Pharmacol Exp Ther **357**(1): 145-156.
- Winkelstein, B. A., M. D. Rutkowski, et al. (2001). "Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment." J Comp Neurol **439**(2): 127-139.
- Woolf, C. J. and M. W. Salter (2000). "Neuronal plasticity: increasing the gain in pain." Science **288**(5472): 1765-1769.
- Wu, Z. Z., S. R. Chen, et al. (2005). "Transient receptor potential vanilloid type 1 activation down-regulates voltage-gated calcium channels through calcium-dependent calcineurin in sensory neurons." J Biol Chem **280**(18): 18142-18151.
- Xu, J. T., W. J. Xin, et al. (2007). "p38 activation in uninjured primary afferent neurons and in spinal microglia contributes to the development of neuropathic pain induced by selective motor fiber injury." Exp Neurol **204**(1): 355-365.
- Xu, J. T., W. J. Xin, et al. (2006). "The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat." Pain **123**(3): 306-321.
- Xu, Z. Z., L. Zhang, et al. (2010). "Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions." Nat Med **16**(5): 592-597, 591p following 597.
- Yao, J. and F. Qin (2009). "Interaction with phosphoinositides confers adaptation onto the TRPV1 pain receptor." PLoS Biol **7**(2): e46.
- Yesilyurt, O., A. Dogrul, et al. (2003). "Topical cannabinoid enhances topical morphine antinociception." Pain **105**(1-2): 303-308.
- Yoshimura, M. and S. Nishi (1995). "Primary afferent-evoked glycine- and GABA-mediated IPSPs in substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord in vitro." J Physiol **482** (Pt 1): 29-38.
- Youn, D. H., H. Wang, et al. (2008). "Exogenous tumor necrosis factor-alpha rapidly alters synaptic and sensory transmission in the adult rat spinal cord dorsal horn." J Neurosci Res **86**(13): 2867-2875.
- Zhang, G., W. Chen, et al. (2010). "Cannabinoid CB1 receptor facilitation of substance P release in the rat spinal cord, measured as neurokinin 1 receptor internalization." Eur J Neurosci **31**(2): 225-237.
- Zhang, L., T. Berta, et al. (2011). "TNF-alpha contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2." Pain **152**(2): 419-427.
- Zhang, X., J. Huang, et al. (2005). "NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels." EMBO J **24**(24): 4211-4223.
- Zhang, X., L. Li, et al. (2008). "Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150." Neuron **59**(3): 450-461.
- Zhou, H. Y., S. R. Chen, et al. (2009). "The glutamatergic nature of TRPV1-expressing neurons in the spinal dorsal horn." J Neurochem **108**(1): 305-318.
- Zhou, H. Y., H. M. Zhang, et al. (2007). "Increased nociceptive input rapidly modulates spinal GABAergic transmission through endogenously released glutamate." J Neurophysiol **97**(1): 871-882.

- Zhou, H. Y., H. M. Zhang, et al. (2008). "Increased C-fiber nociceptive input potentiates inhibitory glycinergic transmission in the spinal dorsal horn." J Pharmacol Exp Ther **324**(3): 1000-1010.
- Zhou, L. J., T. Yang, et al. (2011). "Brain-derived neurotrophic factor contributes to spinal long-term potentiation and mechanical hypersensitivity by activation of spinal microglia in rat." Brain Behav Immun **25**(2): 322-334.
- Zhou, L. J., Y. Zhong, et al. (2008). "BDNF induces late-phase LTP of C-fiber evoked field potentials in rat spinal dorsal horn." Exp Neurol **212**(2): 507-514.
- Zygmunt, P. M., J. Petersson, et al. (1999). "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide." Nature **400**(6743): 452-457.

9 Seznam publikací autora

(Publikace *in extenso*, které jsou podkladem této dizertační práce.)

- Nerandzic, V., Mrozkova, P., Adamek, P., Spicarova, D., Nagy, I., and Palecek, J. (2017) Peripheral inflammation affects modulation of nociceptive synaptic transmission in the spinal cord induced by N-arachidonoylphosphatidylethanolamine. *British Journal of Pharmacology*, doi: [10.1111/bph.13849](https://doi.org/10.1111/bph.13849). (IF= 5,491, 2017)
- Spicarova D, Nerandzic V, Palecek J (2011). Modulation of spinal cord synaptic activity by tumor necrosis factor alpha in a model of peripheral neuropathy. *Journal of neuroinflammation* **8**: 177. doi: 10.1186/1742-2094-8-177. (IF=3.827, 2011)
- Spicarova D, Nerandzic V, Palecek J (2014). Update on the role of spinal cord TRPV1 receptors in pain modulation. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **63 Suppl 1**: S225-236. (IF=1.293, 2014)
- Manuskript: Nerandzic, V. and Palecek, J. (2018) Modulation of spinal cord synaptic activity by N-arachidonoylphosphatidylethanolamine (20:4-NAPE) in a model of peripheral inflammation.

10 Příloha – originály plných textů publikací